

NARA LINS MEIRA QUINTÃO

**ANÁLISE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA GÊNESE E
NA MANUTENÇÃO DAS RESPOSTAS HIPERNOCICEPTIVAS
INDUZIDAS PELA AVULSÃO DO PLEXO BRAQUIAL EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis
2006

QUINTÃO, Nara Lins Meira. **Análise dos mecanismos envolvidos na gênese e na manutenção das respostas hipernociceptivas induzidas pela avulsão do plexo braquial em camundongos.** Florianópolis, 2006, 126p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. João Batista Calixto

Defesa: 08/12/2006

A proposta deste estudo foi investigar os mecanismos envolvidos nas respostas hipernociceptivas induzidas pela avulsão do plexo braquial em camundongos. A avulsão do plexo braquial (APB) em camundongos suíços, C57/BL6 e J192 resultou no aumento persistente da sensibilidade mecânica e térmica na pata traseira direita e cauda. Este modelo é caracterizado também pela ausência de resposta na pata cirurgiada, bem como de sinais de prostração, entretanto é capaz de causar um déficit de coordenação motora numa fase mais tardia. A citocina $TNF\alpha$, avaliada através da utilização de animais com deleção gênica para o seu receptor p55 ou do anticorpo anti- $TNF\alpha$ e a talidomida, demonstrou ter um papel fundamental na instalação das respostas hipernociceptivas mecânica e térmica após a APB. Os fatores neurotróficos NGF, GDNF, BDNF e NT-3 também parecem participar da gênese das alterações na sensibilidade mecânica dos animais, uma vez que seus respectivos anticorpos foram capazes de retardar o aparecimento da hipernocicepção. Entretanto, apenas o BDNF parece ter um papel importante na manutenção do quadro hipernociceptivo induzido pela APB. Com base nos resultados obtidos com animais com deleção gênica para os receptores B_1 ou B_2 , bem como com antagonistas seletivos para cada receptor (R-715 e o SSR240612; HOE-140), podemos sugerir que o receptor B_1 participa da perpetuação das respostas hipernociceptivas, envolvendo principalmente estruturas supra-espinhais numa fase mais tardia da patologia. Em contrapartida, o receptor B_2 não parece estar significativamente envolvido na gênese e na manutenção da hipernocicepção mecânica e térmica induzidas pela APB. Estes dados contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na dor neuropática.

Palavras-chaves: Plexo braquial, dor neuropática, hipernocicepção, $TNF\alpha$, fatores neurotróficos, cininas.

Depois de algum tempo você....

... aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem costume de cair em meio ao vão.

... Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.

E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.

E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam, percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa - por isso, sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos.

... Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.

... Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve.

... Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter trilhado os caminhos de minha vida, e me dado condições para alcançar tudo o que até hoje almejei. Confiar nele me fez acreditar que tudo é possível.

Ao professor Dr. João Batista Calixto, meu especial agradecimento por ter dado a oportunidade de sua orientação, pelos conhecimentos ofertados, e acima de tudo pela dedicação, amizade e confiança. O seu incentivo e paixão pela ciência fizeram com que eu seguisse em frente. Agradeço também pela oportunidade de aprender muito além do que fiz neste trabalho, e principalmente por ter me convidado a participar do projeto “Jovens Talentos”, que certamente guardarei na memória por toda a vida.

A meus irmãos Guilherme e Pedro, e em especial a minha amada e companheira mãe Glaucione, por ter suportado a saudade, mas sempre me ajudando a vencer as dificuldades. Sempre sonhando com o dia em que voltaria para casa, agora, já não tão distante. Muito obrigada pelo incentivo, apoio e carinho.

Ao meu namorado Cristiano, que com muito amor e carinho suportou estes anos de distância. Certamente, a minha ligação com a pesquisa foi fruto deste amor há alguns anos atrás. Obrigada por estar ao meu lado, me ajudando a crescer, a vencer todos os obstáculos e conquistar meus sonhos. Agora sonharemos juntos... Amo muito você...

Aos meus familiares, pela constante preocupação com meu bem estar, e por acreditarem na minha capacidade. Agradeço, também, a minha tia Gleicieda, por ter me ajudado nas correções desta tese.

À minha futura sogra Vera e futuro sogro Nilson, pelo companheirismo, amor, carinho e confiança.

À amiga Martha, que me fez acreditar em minhas capacidades. Mostrou-me que ser responsável é a maior qualidade que alguém pode ter e que, com certeza, colocou mais brilho nos meus olhos. Com muito carinho, agradeço tudo que fez por mim.

Às minhas amigas e companheiras de morada Cláudia e Ana, pelo companheirismo e amizade... Perdão pelos dias de mau humor. Com muito carinho sentirei saudades.

Às minhas amigas Ali, Beth, Gica, Jujú, Paty e amigo Rodrigo pelo carinho e amizade. Sentirei muitas saudades dos dias que passamos juntos. Com certeza guardarei todos na lembrança. E como disse Richard Bach "...haveremos de nos encontrar outra vez, sempre que desejarmos, no meio da única comemoração que não pode jamais terminar".

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia pelo constante companheirismo e por terem compartilhado seus conhecimentos. À Diana e ao Pedro, por ter me ajudado sempre que precisei, e que indiretamente auxiliaram-me no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Giles, Jamil, Pádua, Reinaldo e Rogério, por ter aceitado avaliar este trabalho, no momento da qualificação ou na defesa da tese. Agradeço, também, aos professores Mauro M. Teixeira e Marco Aurélio Martins, por terem se disponibilizado a participar da banca. Certamente, seus conhecimentos irão engrandecer este trabalho.

Aos colegas de pesquisa Allison, Andrey, Carlos, Dani Hara, Dani Leite, Denise, Edinéia, Fernanda, Gustavo, Marina, Marianne e Robson, alunos do projeto "Jovens Talentos", em especial, Bruna, Gabriel e Jonny, e demais colegas de outros laboratórios pela amizade, colaboração, troca de informações, tentando tornar a convivência a melhor possível.

À CAPES e ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE ABREVIACÕES | i |
| LISTA DE FIGURAS | iv |
| LISTA DE TABELAS | vi |
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | ix |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1. DOR | 01 |
| 1.2. DOR NEUROPÁTICA | 05 |
| 1.2.1. Avulsão do plexo braquial | 14 |
| 1.2.2. Mecanismos envolvidos na dor neuropática | 17 |
| 1.2.2.1. TNF α e dor neuropática | 18 |
| 1.2.2.2. Fatores neurotróficos e dor neuropática | 19 |
| 1.2.2.3. Cininas e dor neuropática | 22 |
| 2. OBJETIVOS | 26 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 26 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3.1. ANIMAIS | 28 |
| 3.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA A AVULSÃO DO PLEXO BRAQUIAL | 29 |
| 3.3. ANÁLISE DO LIMiar MECÂNICO ATRAVÉS DO FILAMENTO DE VON FREY | 30 |
| 3.4. ANÁLISE DO LIMiar TÉRMICO ATRAVÉS DO TESTE DE RETIRADA DA CAUDA (TAIL-FLICK) | 30 |
| 3.5. ANÁLISE DO LIMiar TÉRMICO ATRAVÉS DO TESTE DE RETIRADA DA PARA (HARGREAVES) | 31 |
| 3.6. ATIVIDADE LOCOMOTORA (CAMPO ABERTO) | 31 |
| 3.7. EFEITO SOBRE O DESEMPENHO MOTOR (ROTA-ROD) | 31 |
| 3.8. AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS À APB | 32 |
| 3.9. ANÁLISE DE ALGUNS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA GÊNESE E NA MANUTENÇÃO DAS RESPOSTAS HIPERNOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA APB EM CAMUNDONGOS | 32 |
| 3.9.1. Participação da citocina TNF α | 32 |
| 3.9.1.1. Limiar mecânico e térmico de animais TNF α p55-/- submetidos à APB | 32 |
| 3.9.1.2. Efeito de estratégias anti-TNF α nas respostas | |

| | |
|--|-----------|
| hipernociceptivas induzidas pela APB ----- | 33 |
| 3.9.2. Participação dos fatores neurotróficos ----- | 33 |
| 3.9.2.1. Efeitos dos anticorpos anti-fatores-neurotróficos sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB ----- | 33 |
| 3.9.3. Participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas ----- | 34 |
| 3.9.3.1. Limiar mecânico e térmico de animais B₁R^{-/-} e B₂R^{-/-} submetidos à APB ----- | 34 |
| 3.9.3.2. Efeitos do antagonista seletivo para o receptor B₂ para cininas sobre a resposta hipernociceptiva induzida pela APB ----- | 34 |
| 3.9.3.3. Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B₁ sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB ----- | 35 |
| 3.10. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO ----- | 36 |
| 3.10.1. Administração local ----- | 36 |
| 3.10.2. Administração intratecal (i.t.) ----- | 36 |
| 3.10.3. Administração intracerebroventricularl (i.c.v.) ----- | 36 |
| 3.11. ENSAIOS BIOQUÍMICOS ----- | 37 |
| 3.11.1. Quantificação do RNA mensageiro para o receptor B₁ das cininas ----- | 37 |
| 3.11.1.1. Ensaio de RT-PCR ----- | 37 |
| 3.11.2. Expressão dos receptores B₁ e B₂ para cininas ----- | 38 |
| 3.11.2.1. Preparação dos tecidos para o ensaio de Western Blot ----- | 38 |
| 3.11.2.2. Ensaio de Western Blot ----- | 39 |
| 3.12. DROGAS E REAGENTES ----- | 39 |
| 3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA ----- | 40 |
| 4. RESULTADOS ----- | 42 |
| 4.1. RESPOSTAS HIPERNOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA APB EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS ----- | 42 |
| 4.2. RESPOSTA HIPERNOCICEPTIVA NAS PATAS DIANTEIRAS DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS SUBMETIDOS À APB----- | 44 |
| 4.3. PESO CORPORAL, ATIVIDADE LOCOMOTORA E COORDENAÇÃO MOTORA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS SUBMETIDOS À APB ----- | 45 |
| 4.4. ANÁLISE DOS DIFERENTES MECANISMOS ENVOLVIDOS NA GÊNESE E NA MANUTENÇÃO DAS RESPOSTAS HIPERNOCICEPTIVAS INDUZIDAS PELA APB EM CAMUNDONGOS ----- | 47 |
| 4.4.1. Participação da citocina TNFα ----- | 47 |
| 4.4.1.1. Limiar mecânico e térmico de animais TNFα p55^{-/-} submetidos à APB ----- | 47 |
| 4.4.1.2. Efeito do anticorpo anti-TNFα e da talidomida na indução da resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela APB em | |

| | |
|---|-----|
| camundongos ----- | 49 |
| 4.4.1.3. Efeito do anticorpo anti-TNF α ou da talidomida na manutenção da resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela APB em camundongos ----- | 51 |
| 4.4.2. Participação dos fatores neurotróficos ----- | 52 |
| 4.4.2.1. Efeito da administração de anticorpos contra determinados fatores neurotróficos sobre a gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB ----- | 52 |
| 4.4.2.2. Efeito da administração de anticorpos anti-fatores-neurotróficos sobre a manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB ----- | 58 |
| 4.4.3. Participação dos receptores B ₂ e B ₁ para cininas ----- | 62 |
| 4.4.3.1. Limiar mecânico e térmico de animais B ₂ R-/- submetidos à APB ----- | 62 |
| 4.4.3.2. Efeito do antagonista seletivo para o receptor B ₂ para cininas sobre a resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela APB em camundongos ----- | 63 |
| 4.4.3.3. Limiar mecânico e térmico de animais B ₁ R-/- submetidos à APB ----- | 64 |
| 4.4.3.4. Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B ₁ para cininas sobre a resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela APB em camundongos ----- | 66 |
| 4.4.4. Análise de biologia molecular ----- | 72 |
| 4.4.4.1. Efeito da APB sobre o aumento do RNAm para o receptor B ₁ em estruturas do SNC de camundongos ----- | 72 |
| 4.4.4.2. Efeito da APB sobre o aumento da expressão dos receptores B ₁ e B ₂ para cininas na medula espinhal de camundongos ----- | 74 |
| 5. DISCUSSÃO ----- | 75 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----- | 100 |
| 7. ANEXOS ----- | 126 |

LISTA DE ABREVIÇÕES

| | |
|---------------------------------|--|
| aa | Aminoácidos |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| AINEs | Antiinflamatórios não esteroidais |
| ANOVA | Análise de variância |
| AP-1 | Proteína ativada 1 |
| APB | Avulsão do plexo braquial |
| B | Basal |
| B ₁ R ^{-/-} | Animal com deleção gênica para o receptor B ₁ |
| B ₂ R ^{-/-} | Animal com deleção gênica para o receptor B ₂ |
| BDNF | Fator neurotrófico derivado do cérebro |
| BK | Bradicinina |
| °C | Graus centígrados |
| Ca ²⁺ | Íon cálcio |
| CFA | Complete Freund's adjuvant |
| CGRP | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina |
| cm | Centímetro |
| COX | Cicloxigenase |
| DNA | Ácido desoxiribonucléico |
| DNAc | DNA complementar |
| DRG | Gânglio da raiz dorsal |
| E.P.M. | Erro padrão da média |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| g | Grama |
| G | Gauge |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GDNF | Fator neuronal derivado de células da glia |
| GFR α | Glicosilfosfoinositol- α |
| h | Hora |
| I.A.S.P. | Associação Internacional do Estudo da Dor |
| IL-1 β | Interleucina-1 β |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| i.c.v. | Intracerebroventricular |

| | |
|-----------------|---|
| IgG | Imunoglobulina G |
| i.pl. | Intraplantar |
| i.p. | Intraperitoneal |
| i.t. | Intratecal |
| i.v. | Intravenoso |
| kDa | Quilodaltons |
| kg | Quilograma |
| LTP | Potencialização de longo prazo |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| M | Molar |
| µg | Micrograma |
| µl | Microlítro |
| mRNA | Ácido ribonucléico mensageiro |
| N | Naive |
| Na ⁺ | Íon sódio |
| NF-κB | Fator Nuclear κB |
| ng | Nanograma |
| NGF | Fator de crescimento neuronal |
| nmol | Nanomol |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NT-3 | Neurotrofina-3 |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PAF | Fator de ativação plaquetária |
| PBS | Salina tampão fosfato |
| RT | Transcrição reversa |
| RT-PCR | Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase |
| s | Segundos |
| s.c. | Subcutâneo |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNP | Sistema nervoso periférico |
| SP | Substância P |

| | |
|---------------------------------|---|
| TBE | Tris/borato/EDTA |
| TNF α | Fator de necrose tumoral α |
| TNF α p55 ^{-/-} | Animal com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α |
| TrkA | Tirosina quinase A |
| TrkB | Tirosina quinase B |
| TrkC | Tirosina quinase C |
| TRPV1 | Receptor de Potencial Transitório 1 |
| U | Unidades |
| VFH | Filamento de von Frey (<i>von Frey Hair</i>) |
| v.o. | Via oral |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Vias envolvidas na dor neuropática periférica e sítios potenciais de intervenção farmacológica. ----- | 08 |
| Figura 2 – Representação esquemática de diferentes lesões nervosas. ----- | 13 |
| Figura 3 – Representação esquemática da formação anatômica do plexo braquial. -- | 15 |
| Figura 4 - Ilustração demonstrando os procedimentos cirúrgicos da APB. ----- | 29 |
| Figura 5 – Hipernocicepção mecânica e térmica induzidas pela APB em camundongos suíços. ----- | 43 |
| Figura 6 – Padronização da resposta hipernociceptiva mecânica nas patas dianteiras de camundongos submetidos à APB. ----- | 44 |
| Figura 7 – (A) Peso corporal, (B) atividade locomotora e (C) coordenação motora de camundongos suíços submetidos à APB. ----- | 46 |
| Figura 8 – Hipernocicepção mecânica e térmica induzidas pela APB em camundongos com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α . ----- | 48 |
| Figura 9 – Efeito do anticorpo anti-TNF α na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 49 |
| Figura 10 - Efeito do anticorpo anti-TNF α ou da talidomida na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 50 |
| Figura 11 – Efeito do anticorpo anti-TNF α ou da talidomida na manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 51 |
| Figura 12 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados localmente, na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 53 |
| Figura 13 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados sistemicamente, na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 55 |
| Figura 14 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados por via i.t., na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 56 |
| Figura 15 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados por via i.c.v., na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. -- ----- | 57 |
| Figura 16 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados sistemicamente, na manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 58 |
| Figura 17 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados por via i.t., na manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 18 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados por via i.c.v., na manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 60 |
| Figura 19 – Efeito da IgG sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 61 |
| Figura 20 – Hipernocicepção mecânica e térmica induzidas pela avulsão do plexo braquial em camundongos com deleção gênica para o receptor B ₂ para cininas. ----- | 62 |
| Figura 21 – Efeito do antagonista seletivo para o receptor B ₂ , HOE-140, sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 63 |
| Figura 22 – Hipernocicepção mecânica e térmica induzidas pela avulsão do plexo braquial em camundongos com deleção gênica para o receptor B ₁ para cininas. ----- | 65 |
| Figura 23 – Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B ₁ , administrados no momento da cirurgia, sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 67 |
| Figura 24 – Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B ₁ , administrados no 4º dia após a cirurgia, sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 69 |
| Figura 25 – Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B ₁ , administrados no 30º dia após a cirurgia, sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. ----- | 71 |
| Figura 26 – Quantificação do RNAm para o receptor B ₁ em estruturas do SNC de camundongos após a APB. ----- | 73 |
| Figura 27 – Expressão do receptor B ₁ e B ₂ na medula espinhal de camundongos 4 dias após a APB. ----- | 74 |
| Figura 28 – Proposta para os possíveis mecanismos envolvidos na gênese e na manutenção das respostas hipernociceptivas induzidas pela APB em camundongos. | 99 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Deficiências observadas no animais com deleção gênica para as neurotrofinas e seus receptores. ----- 89

RESUMO

A avulsão do plexo braquial (APB) em camundongos (Swiss, C57/BL6 e J129) produziu sensibilização mecânica e térmica, avaliadas na pata posterior direita e na cauda. Estas sensações alteradas não foram observadas na pata operada. Estes animais também não apresentaram alterações no comportamento, caracterizadas como perda de peso corporal e redução da atividade locomotora. Dados obtidos com animais com deleção gênica para o receptor p55 do $\text{TNF}\alpha$, anticorpos anti- $\text{TNF}\alpha$ ou a talidomida demonstraram que o $\text{TNF}\alpha$ tem um papel fundamental no estabelecimento da hipernocicepção mecânica e térmica. Além do mais, foi verificado, utilizando anticorpos contra fatores neurotróficos, que o NGF, o GDNF, o BDNF e o NT-3 têm um papel prévio no processo de hipernocicepção mecânica induzida pela APB, provavelmente na sensibilização de neurônios sensoriais medulares. Por outro lado, apenas o BDNF pareceu ter importância para a manutenção das respostas hipernociceptivas neste modelo. O receptor B_1 para cininas, mas não o receptor B_2 para cininas, pareceu desempenhar um papel significativo na gênese das respostas hipernociceptivas, confirmado através do uso de animais com deleção gênica para cada um dos receptores (B_1 ou B_2). Além disso, o receptor B_1 demonstrou ter uma importante participação na manutenção destas alterações sensoriais através da utilização de antagonistas seletivos para o receptor b_1 ou receptor B_2 . Nós sugerimos neste estudo que os mediadores citados acima, e o receptor b_1 parecem iniciar a cascata de eventos responsável pelo estado hipernociceptivo neste modelo de dor neuropática. Por outro lado, o fator neurotrófico BDNF e o receptor B_1 para cininas parecem estar fundamentalmente relacionados com a manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Estes resultados em conjunto, para o melhor

entendimento dos mecanismos envolvidos na instalação e na manutenção da dor neuropática.

ABSTRACT

Brachial plexus avulsion (BPA) in mice (Swiss, C57/BL6 and J129) produced long-lasting mechanical and thermal sensitization, which were evaluated in the right hindpaw and in the tail. These altered sensations were not observed in the operated paw. The animals also did not show a sickness behaviour characterized by weight loss and decrease of locomotor activity. Data obtained with knockout $\text{TNF}\alpha$ $\text{p55}^{-/-}$ mice, antibody anti- $\text{TNF}\alpha$ or thalidomide demonstrated that $\text{TNF}\alpha$ has a fundamental role in the onset of mechanical and thermal hypernociception. Furthermore, it was verified, by using antibodies against neurotrophic factors, that NGF, GDNF, BDNF and NT-3 have a role earlier in the process of mechanical hypernociception induced by BPA, probably in the sensitization of spinal sensory neurones. On the other hand, only BDNF seemed to have importance for the maintenance of hypernociceptive responses in this model. B_1 kinin receptor, but not B_2 kinin receptor, appeared to play a significant role in the genesis of hypernociceptive responses, confirmed by the use of knockout mice for each receptor (B_1 or B_2). Moreover, B_1 receptor has an important participation on the maintenance of these sensory alterations using selective antagonists. We suggested here that the mediators cited above, and the B_1 receptor seem to initiate a cascade of events responsible for the hypernociceptive state in this neuropathic pain model. On the other hand, the neurotrophic factor BDNF and B_1 kinin receptor seem to be fundamentally related to the maintenance of mechanical hypernociception induced by BPA in mice. These results together, collaborate for better understand the mechanisms involved on the onset and on the maintenance of neuropathic pain.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor

O sistema sensorial tem a função de informar o cérebro sobre o estado dos ambientes externo e interno do corpo. A dor, enquanto modalidade de percepção, constitui um sistema de alarme que tem o papel de proteger o organismo de uma lesão tecidual, através da ativação de mecanismos que envolvem vias reflexas espinhais e supra-espinhais (DRAY, 1995; JULIUS e BASBAUM, 2001; LE BARS et al., 2001).

O Congresso de Dor da Associação Internacional para o Estudo da Dor (I.A.S.P.) em 1973 foi considerado um marco para o estudo científico da dor. Richard Black e John D. Loeser desenvolveram um esquema geral reunindo os principais termos relacionados com nocicepção, dor, sofrimento e comportamento doloroso, publicado no primeiro volume da revista *Pain* em 1975 (LOESER e BLACK, 1975; LOESER, 2000). Entretanto, há mais de um século, Sherrington (1906) havia sugerido a existência de nociceptores, representados por neurônios sensoriais primários, que seriam ativados por estímulos periféricos capazes de gerar danos teciduais, transformando os estímulos iniciais em impulsos nervosos. Desta forma, o calor, o frio, a pressão, a distensão, os traumas, os estímulos químicos, dentre outros, podem, direta ou indiretamente, ativar os nociceptores (BESSOU e PERL, 1969; HANDWERKER e REEH, 1994).

A dor pode ser modulada por uma série de experiências comportamentais, pois não envolve somente a transmissão do estímulo nocivo, mas também fatores emocionais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos (MERSKEY, 1979; RUSSO e BROSE, 1998; JULIUS e BASBAUM, 2001). Nem todo estímulo nocivo que ativa os nociceptores resulta necessariamente em uma experiência dolorosa. A relação entre a ativação dos nociceptores e a percepção da dor envolve um complexo processamento

através das vias sensoriais e, a natureza altamente subjetiva da dor dificulta sua compreensão e seu tratamento clínico (BASBAUM e JESSEL, 2000).

Sendo assim, se faz necessária a distinção entre os termos dor e nocicepção. Nocicepção refere-se somente à percepção sensorial no sistema nervoso central (SNC), evocada pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), existentes no local estimulado (FÜRST, 1999). Entretanto, a dor envolve funções cerebrocorticais com ativação dos componentes discriminativo, afetivo-motivacional, cognitivo e locomotor (RIEDEL e NEECK, 2001). Em 1979, Merskey definiu a dor como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial”. Esta definição foi então adotada pela I.A.S.P. e permanece até os dias atuais.

As terminações periféricas sensoriais livres são responsáveis por transmitir o sinal nociceptivo da periferia para os neurônios secundários do corno dorsal da medula. Estes, por sua vez, remetem as informações para os centros integrados do SNC através de vias ascendentes da medula espinhal (DRAY e PERKINS, 1997; GRUBB, 1998; BESSON, 1999; MILLAN, 1999; URBAN e GEBHART, 1999). São divididas em três categorias, sendo essa divisão, feita segundo o papel exercido pelas fibras na transdução de informações sensoriais nas terminações aferentes primárias antes da sua transmissão à medula espinhal (para revisão ver: MILLAN, 1999). Corpos celulares de grande diâmetro são característicos das fibras sensoriais primárias $A\alpha$ e $A\beta$, mielinizadas e de condução rápida, responsáveis pela informação proprioceptiva (toque leve e pressão) (TOREBJÖRK et al., 1992). Na segunda categoria encontram-se os neurônios de corpos celulares de pequeno e médio diâmetro, formados por fibras C amielinizadas de condução lenta (aproximadamente 0,5-2 m/s). Finalmente, existem as fibras $A\delta$ mielinizadas de condução rápida, quando comparadas às fibras C

(aproximadamente 5-30 m/s). A maior parte dos nociceptores é representada por fibras amielinizadas de pequeno e médio diâmetro, incluindo os nociceptores polimodais, que são ativados por uma variedade de estímulos mecânicos, químicos e térmicos de alta intensidade (MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999; FUCHS et al., 2000; MAGERL et al., 2001; STUCKY et al., 2001). Sob circunstâncias normais, apenas as fibras C e A δ transmitem informações nociceptivas. Porém, estudos utilizando animais transgênicos em conjunto com abordagens fisiológicas, farmacológicas e bioquímicas, têm demonstrado a participação das três categorias de fibras sensoriais nos processos de dor persistente (BENSSON, 1999; URBAN e GEBHART, 1999).

A sensação dolorosa é comumente acompanhada de alterações sensoriais descritas na literatura como hiperalgesia (sensibilidade aumentada para um estímulo doloroso), alodínia (percepção alterada para um determinado estímulo) e hiperestesia (sensibilidade anormal dos neurônios sensoriais) (BESSON, 1999; RAJA et al., 1999). Todavia, estudos recentes relatam que, embora a distinção entre hiperalgesia e alodínia em humanos possa apresentar valor clínico, a base molecular desta diferença permanece obscura. Além disso, tem sido sugerida a utilização do termo hipernocicepção, por ser mais apropriado quando se trata de resultados obtidos a partir da avaliação da sensibilidade mecânica em modelos animais (PARADA et al., 2003; SACHS et al., 2004; VERRI et al., 2004; CUNHA et al., 2005; QUINTÃO et al., 2006; SANTODOMINGO-GARZON et al., 2006).

Com relação à duração, a dor pode ser definida como transitória, aguda ou crônica. Tanto na dor transitória como na dor aguda, a causa é bem definida e o curso temporal de ambas é delimitado, podendo desaparecer antes mesmo da remoção da causa ou reparo do dano tecidual. Entretanto, a dor crônica é geralmente causada por lesões ou doenças que superam a capacidade do organismo de reverter o quadro,

podendo persistir até mesmo após o desaparecimento do trauma inicial, estendendo-se por meses ou anos e comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (ASHBURN e STAATS, 1999; LOESER e MELZACK, 1999; LOESER, 2003; SKOTT, 2003). Podem-se destacar ainda alterações adaptativas, como neuroplasticidade, em diferentes níveis do sistema nervoso, tais como sensibilização, perda do controle inibitório da dor, reorganização do circuito neuronal do corno dorsal e alterações na facilitação e na inibição descendente da dor. Tendo em vista que estes eventos são dependentes da intensidade e duração do estímulo doloroso, quanto mais persistente, mais difícil se torna o tratamento do quadro patológico (BESSON, 1999; WOOLF e SALTER, 2000).

Tanto a dor aguda quanto a dor crônica estão freqüentemente associadas a processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, reatividade imune anormal ou lesão nervosa (STEIN et al., 2003). Na dor crônica, em particular, muitas alterações ocorrem em associação com os eventos básicos da nocicepção, que modificam a relação entre o estímulo e a resposta nociceptiva, afetando a modulação do estado doloroso resultante. Além disso, alterações centrais crônicas na neuroquímica da sinalização da dor produzem hipersensibilidade, aumentando a freqüência e a duração dos impulsos aferentes. Ademais, mudanças estruturais secundárias à lesão nervosa periférica incluem a perda de interneurônios espinhais, rearranjos não apropriados de processos neurais aferentes na medula espinhal e a proliferação de fibras simpáticas no gânglio sensorial. Essas mudanças não são uniformes e dependem do tipo de lesão tecidual, do envolvimento de tipos específicos de fibras e da participação do sistema imune (DRAY et al., 1994; PERKINS e TRACEY, 2000; WATKINS e MAIER, 2002; DOGRUL et al., 2003). Outro aspecto que dificulta o desenvolvimento de terapias racionais e efetivas para o tratamento de processos dolorosos crônicos é a falta de

conhecimento do quanto os mecanismos envolvidos diferem daqueles implicados na dor aguda (ALEY et al., 2000).

1.2. Dor neuropática

Segundo o Comitê de Taxonomia da IASP, a dor neuropática é definida como “distúrbio da função ou alterações patológicas de células nervosas”. Teoricamente, as neuropatias poderiam ser facilmente distinguidas das demais condições patológicas, porém na prática, são difíceis de diagnosticar ou tratar (para revisão ver: JENSEN e BARON, 2003).

A dor neuropática geralmente faz parte do quadro de processos dolorosos crônicos e engloba um conjunto de condições extremamente heterogêneas, nas quais não pode ser definida uma única etiologia, nem mesmo quando há ocorrência de uma lesão anatômica particular (SINDRUP e JENSEN, 1999). As neuropatias que causam dor em humanos podem resultar de lesão nervosa (mono ou polineuropatia), uso crônico de determinadas drogas (vincristina, cisplatina e taxol) ou ainda estarem associadas a algumas doenças (câncer, herpes, AIDS) ou transtornos metabólicos (diabetes) (BARON, 2000). Estima-se que 1 % da população mundial sofra de dor neuropática (NICHOLSON, 2000).

Estas síndromes compreendem combinação complexa de sintomas negativos ou déficits sensoriais, como perda completa ou parcial da sensibilidade e sintomas positivos que incluem disestesia, parestesia e dor. A atividade espontânea das fibras C nociceptivas parece ser responsável pela sensação permanente de dor em queimação e, também, pela sensibilização dos neurônios do corno dorsal da medula. Da mesma maneira, a atividade espontânea de fibras A mielinizadas de grande diâmetro (que normalmente identifica estímulos inócuos) está relacionada à parestesia independente

de estímulo e, após sensibilização do SNC, à disestesia e à dor (para revisão ver: WOOLF e MANNION, 1999).

Tanto mecanismos periféricos quanto centrais podem gerar e modular a dor neuropática (Figura 1). Os mecanismos periféricos que ocorrem após uma lesão de nervo periférico têm sido extensivamente estudados, porém ainda existem muitos pontos a serem esclarecidos. No momento em que o nervo periférico é lesionado, alguns componentes da resposta inflamatória são liberados (TRACEY e WALKER, 1995), provavelmente associados à remoção dos axônios ou células de Schwann que sofreram degeneração, devido à falta de suprimento energético oriundo do corpo celular (localizado em um gânglio da raiz dorsal). São também liberados, a partir da fibra nervosa lesionada e de células como neutrófilos e macrófagos que migram para o sítio da lesão, muitos mediadores químicos, incluindo a serotonina, substância P (SP), histamina, bradicinina (BK), fator de ativação plaquetária (PAF), além de produtos das vias da ciclooxygenase e da lipoxigenase, capazes de sensibilizar as fibras sensoriais periféricas, resultando no aumento da responsividade a estímulos mecânicos e térmicos no sítio da lesão (WOOLF e CHONG, 1993; SIDDALL e COUSINS, 1997; BENNETT, 1999; para revisão ver: STACEY, 2005).

Contudo, a porção proximal à lesão sobrevive formando um neuroma, que, por sua vez, produz descargas ectópicas que chegam ao SNC e são interpretadas como originadas do membro lesionado (MACFARLANE et al., 1997). As descargas ectópicas periféricas provocam reorganização e alterações nas fibras sensoriais que chegam ao corno dorsal da medula espinhal e, como conseqüência, a dor passa progressivamente a ser controlada por vias do SNC, resultando na sua amplificação e na persistência do quadro hipernociceptivo (IGNATOWSKI et al., 1999; SCHWARTZMAN et al., 2001). Ocorre uma queda do controle inibitório da dor, causado pela diminuição dos

receptores para opióides e ácido γ -aminobutírico (GABA) e por perda de interneurônios inibitórios decorrentes da excitotoxicidade (WOOLF e MANNION, 1999). Dessa maneira, os estímulos excitatórios periféricos podem tornar-se exagerados e os neurônios do corno dorsal da medula espinhal podem despolarizar-se espontaneamente. Além disso, as fibras A β (de baixo limiar), que normalmente transmitem estímulos mecânicos inócuos, reorganizam-se anatomicamente e passam a estabelecer sinapse com neurônios nociceptivos de segunda ordem na lâmina II da medula espinhal, participando da transmissão da dor (MACFARLANE et al., 1997; WOOLF e MANNION, 1999). A lesão axonal também causa transporte retrógrado de proteínas ao núcleo, causando hiperexcitabilidade do soma (na raiz do gânglio dorsal) e degeneração trans-sináptica (YAMAMOTO e YAKSH, 1993; WATKINS et al., 1995). Com a queda da atividade dos mecanismos inibitórios fisiológicos de controle da dor, a estimulação das fibras C causa liberação de glutamato, SP e CGRP, que, por sua vez, sensibilizam os neurônios secundários do corno dorsal da medula espinhal. A sensibilização central também está implicada com o fenômeno de hiperalgesia secundária, isto é, hiperalgesia em sítios vizinhos à lesão (WOOLF e MANNION, 1999).

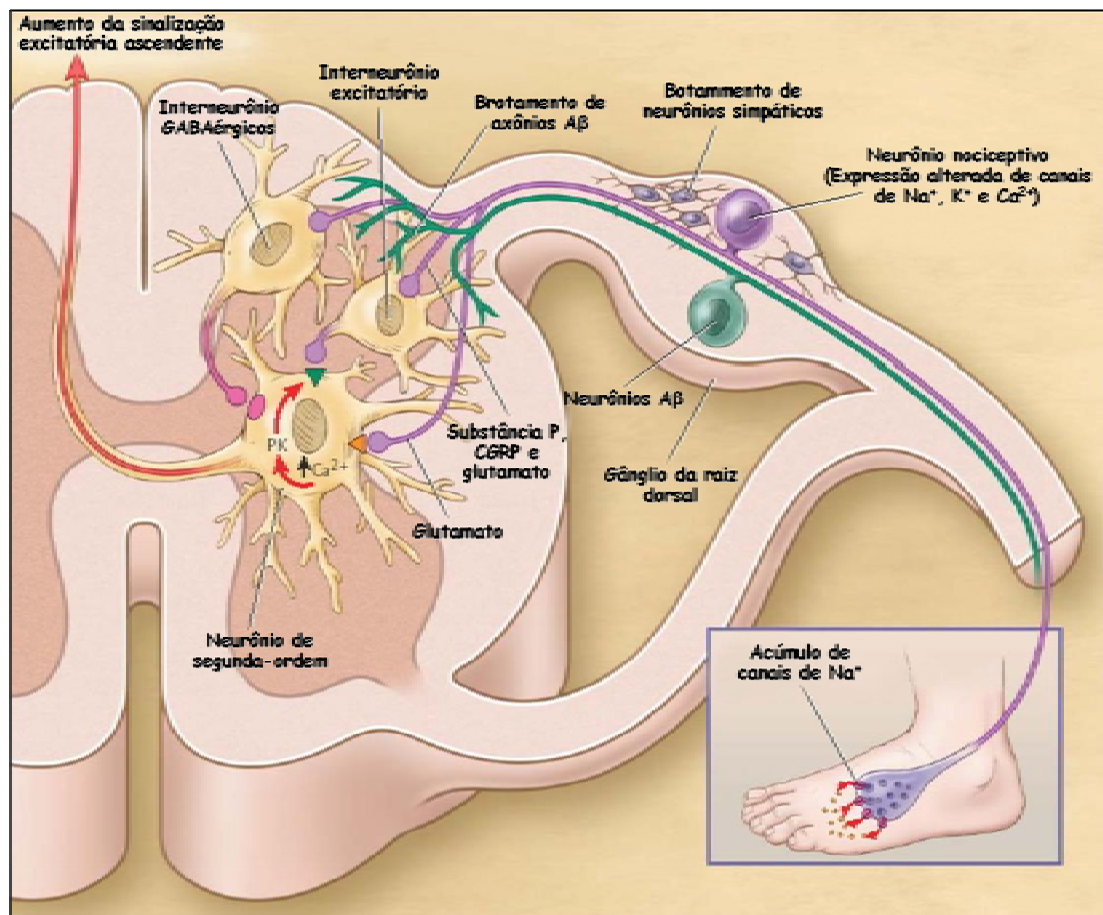


Figura 1. Vias envolvidas na dor neuropática periférica e sítios potenciais de intervenção farmacológica. Após a lesão de um nervo periférico, uma cascata de eventos causa o aumento na expressão de canais iônicos nos neurônios nociceptivos do DRG. Ocorre brotamento de axônios simpáticos que se entrelaçam ao redor dos corpos celulares do DRG. No sítio da lesão nervosa periférica, canais de sódio brotam ao longo do axônio resultando em descargas neurais ectópicas. As projeções dos neurônios nociceptivos do DRG aos interneurônios espinhais aumentam a excitabilidade através da liberação de substância P, CGRP e glutamato. O neurônio de segunda ordem, o qual é normalmente ativado pela ação do glutamato sobre os receptores do tipo AMPA (triângulo laranja), é induzido a disparar de forma espontânea (sensibilização central) através da ativação do receptor NMDA (triângulo verde). A ativação do neurônio de segunda ordem induz o aumento do cálcio intracelular e ativação de proteínas quinases que fosforilam proteínas intracelulares tais, como receptores NMDA. Ocorre uma perda do processo de inibição dos neurônios de segunda ordem devido à redução da ação do ácido γ -aminobutírico (GABA) através da redução da expressão dos receptores GABA_A (oval rosa). O brotamento de terminais centrais de neurônios não-nociceptivos no DRG (neurônios A β) expressam substâncias nociceptivas no corno dorsal da medula, contribuindo para o surgimento da hiperalgesia e alodínia mecânica. *Adaptado de MENDELL e SAHENK (2003).*

Na prática clínica, tem sido extensivamente descrito que a dor neuropática é de difícil tratamento, pois a maior parte das terapias clássicas para o tratamento da dor não costumam funcionar neste tipo de patologia (ZIMMERMANN, 2001; ERICHSEN e BLACKBURN-MUNRO, 2002; ALEY e LEVINE, 2002; BAUMGÄRTNER et al., 2002;

BOLAY e MOSKOWITZ, 2002; HARDEN e COHEN, 2003). A variedade de opções terapêuticas para o tratamento da dor neuropática tem aumentado nos últimos anos (GALER, 1995), embora a maioria dos tratamentos disponíveis não produza resultados satisfatórios. Dentre os tratamentos farmacológicos disponíveis na clínica incluem-se as drogas antidepressivas, anticonvulsivantes, anestésicos locais, analgésicos opióides e não opióides, drogas antiinflamatórias e antiarrítmicos (GALER, 1995; ATTAL, 2000; SAH et al., 2003; GUSTAFSSON et al., 2003; KVARNSTROM et al., 2003).

Os inibidores da ciclooxygenase (COX) fazem parte da lista de medicamentos de escolha da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento da dor crônica. Existem evidências de que os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) exercem alguns dos seus efeitos analgésicos através de suas ações na medula espinhal e que as drogas previnem o efeito de tolerância decorrente do uso de opióides (MALMBERG e YAKSH, 1992). Entretanto, a literatura ainda é inconsistente no que diz respeito à eficácia do tratamento da dor neuropática em longo prazo. É importante levar em conta os efeitos adversos decorrentes da utilização prolongada dos AINEs, podendo acarretar disfunções renais e gastrointestinais (NAMAKA et al., 2004).

Tem sido demonstrado que os antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, tais como a quetamina e o dextrometorfano, inibem tanto a produção como a manutenção do estado de hipersensibilidade dolorosa em diversos modelos pré-clínicos de dor crônica, apresentando eficácia clínica. Contudo, a utilização destas drogas por humanos produz efeitos colaterais importantes que limitam a seu emprego clínico, tais como sedação, disforia e alucinação (SANG, 2000; MARTIN e EISENACH, 2001).

Os antidepressivos tricíclicos têm sido utilizados no tratamento de pacientes com neuropatia diabética desde 1970. Seus efeitos analgésicos parecem ser independentes

dos efeitos antidepressivos, pois em doses muito menores do que quando utilizados para o tratamento da depressão, eles são efetivos em reduzir os sintomas algícos na maioria dos pacientes com dor crônica (MCQUAY e MOORE, 1997; STACEY, 2005). Os mecanismos pelos quais estas drogas exercem esses efeitos não são bem conhecidos, mas sua utilização é limitada em virtude de sua ação lenta (de dias a semanas), dos seus efeitos anticolinérgicos (boca seca, visão turva, confusão mental, sedação e retenção urinária), e da toxicidade cardíaca potencial (MARTIN e EISENACH, 2001; GALLUZZI, 2005).

O tratamento tópico da dor neuropática inclui o adesivo de lidocaína 5%, o gel de quetamina e a capsaicina. Esses tratamentos funcionam localmente, diretamente no sítio de aplicação, com efeitos sistêmicos mínimos (STACEY, 2005). Porém, no início do tratamento, a capsaicina pode causar uma sensação de queimação no local da aplicação, que parece ser reduzida nas aplicações seguintes (YOSIPOVITCH et al., 1999). Outra questão importante é que, para a aplicação tópica destes agentes, a pele deve estar intacta, sem a presença de ulcerações ou irritações cutâneas (STACEY, 2005).

Outras drogas, como antiepilépticos e anticonvulsivantes (carbamazepina e fenitoína), são comumente administradas a pacientes com dor crônica, porém apresentam alto índice de efeitos colaterais, também observados no tratamento combinado com antidepressivos (sonolência, tonturas, sintomas gastrointestinais, edema periférico, ataxia e fadiga muscular). Porém, uma nova droga anticonvulsivante, a gabapentina, vem sendo amplamente utilizada no tratamento da dor crônica (GORDON e LOVE, 2004). A clara eficácia deste agente em pacientes com dor crônica, assim como a sua tolerabilidade (BACKONJA e GLANZMAN, 2003) motivou os vários estudos pré-clínicos para a elucidação do mecanismo de ação da gabapentina.

Atualmente, propõe-se que a gabapentina interage com a subunidade $\alpha 2\delta$ de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, sem agir em receptores GABA ou em canais de Na^+ (HANESCH et al., 2003).

Além do alívio limitado da dor neuropática obtido com estas drogas, o tratamento se torna ainda mais difícil em função da janela terapêutica ser normalmente estreita e, principalmente, dos efeitos colaterais difíceis de serem tolerados pelos pacientes. Estima-se que 70 % dos pacientes que sofrem de dor crônica apresentam melhora do quadro com monoterapia tradicional. Outros 15 % a 20 % respondem satisfatoriamente a terapias combinadas. Isto significa que 10 % a 15 % dos pacientes são refratários a todas as formas de farmacoterapias disponíveis na clínica (ILSE, 2002).

Diante deste contexto, a relação entre a etiologia, os mecanismos e os sintomas da dor crônica é bastante complexa. A dor que se manifesta em diversas doenças pode apresentar mecanismos comuns. Por outro lado, um mesmo mecanismo pode ser responsável por muitos sintomas diferentes. Além disso, o mesmo sintoma em dois pacientes pode envolver mecanismos diferentes. Finalmente, mais de um mecanismo pode estar ativado em um único paciente e, ademais, estes mecanismos podem alterar-se no decorrer do processo. Portanto, em pacientes com dor neuropática, é impossível ainda definir com precisão os mecanismos responsáveis pela dor, apenas com base na etiologia ou na distribuição e natureza dos sintomas. Assim, sem a identificação e o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares, uma boa estratégia de tratamento para pacientes com esse tipo de dor não pode ser adotada (WOOLF e MANNION, 1999, ATTAL, 2000).

Como normalmente muitas destas drogas têm efeitos muito mais paliativos do que curativos, existe na atualidade, uma grande necessidade de identificar novas terapias que possam ser úteis no tratamento da dor neuropática. O emprego de

técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e de biologia molecular propiciou um interesse crescente por parte das grandes indústrias farmacêuticas mundiais na identificação de novos alvos terapêuticos, bem como na busca sistemática por novos medicamentos para o tratamento da dor (LOESER, 2000; CALIXTO et al., 2000, 2001; SOMERVILLE, 2000).

Nos últimos 30 anos vários modelos animais foram desenvolvidos para o estudo dos mecanismos básicos envolvidos na dor neuropática. Os modelos animais disponíveis mimetizam com certa variabilidade alguns dos principais sintomas observados clinicamente após a lesão nervosa (para revisão ver: HANSSON e DICKENSON, 2005). Estes modelos, apesar de suas limitações, têm contribuído de forma importante para o entendimento de alguns dos mecanismos implicados na produção e na manutenção da dor neuropática, além de serem úteis para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas (MCMAHON e PRIESTLEY, 1995; SELTZER, 1995; PITCHER et al., 1999; ZIMMERMANN, 2001; SMITH et al., 2002; WANG e WANG, 2003).

Diversos modelos animais de dor neuropática têm sido propostos na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis pela instalação e manutenção do quadro neuropático (Figura 1). A transecção completa ou axotomia do nervo ciático foi o primeiro modelo animal proposto (WALL et al., 1979), que apesar de fornecer informações importantes, possui algumas limitações quanto à coleta de dados na pata desnervada. Como grande parte dos pacientes com dor neuropática apresenta apenas lesão parcial do nervo ciático, Bennett e Xie (1988) padronizaram o modelo de lesão por constrição crônica, onde um fio de sutura é amarrado ao redor no nervo ciático. Outro modelo bastante utilizado atualmente é a constrição parcial do nervo ciático, proposto por Seltzer et al. (1990). Este modelo parece determinar o surgimento de

alterações semelhantes àsquelas observadas na clínica. Mais recentemente, foram desenvolvidos os modelos de constrição dos nervos espinhais e lesão preservada do nervo. No modelo de constrição dos nervos espinhais, proposto por Kim e Chung (1992), apenas as raízes L5 e L6 encontram-se comprometidas. Já no modelo de lesão preservada do nervo, apenas os nervos peroneal e tibial são amarrados, mantendo intacto o nervo sural (DECOSTERD e WOOLF, 2000). Os modelos acima citados foram originalmente desenvolvidos em ratos. Porém, atualmente, já existem adaptações destes modelos para camundongos, tais como constrição parcial ou completa do nervo ciático, transecção de nervos espinhais e constrição espinal lombar (MALMBERG e BASBAUM, 1998; BESSON, 1999; SOMMER te al., 1999; 2001a; FAIRBANKS et al., 2000).

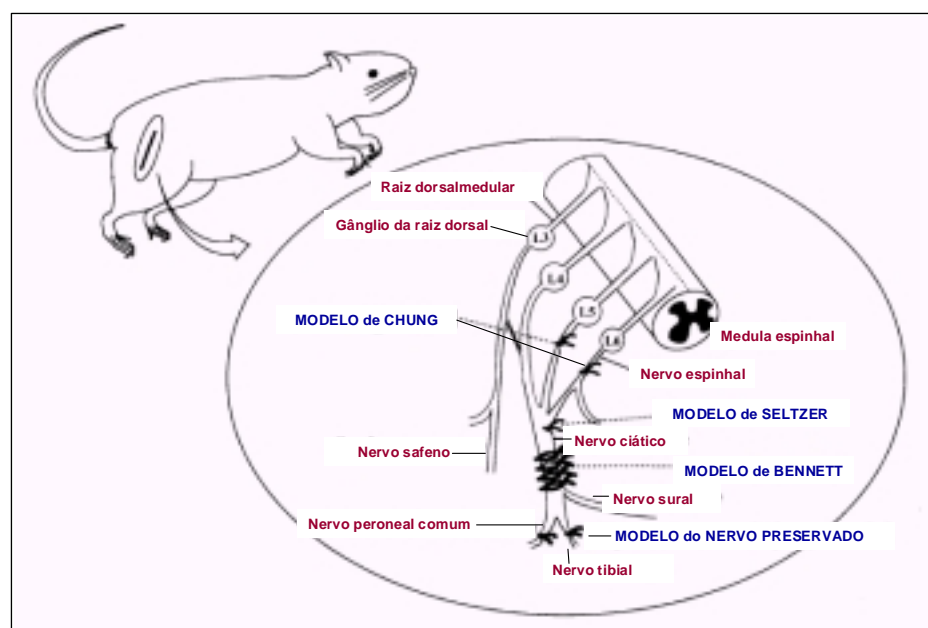


Figura 2. Representação esquemática de diferentes lesões nervosas. Adaptado de UEDA e INOUE (2001).

Embora muitos destes modelos sejam de grande valor para a análise experimental dos mecanismos patológicos no próprio nervo, devido à complexidade

associada à dor neuropática, poucos deles parecem reproduzir desordens nociceptivas semelhantes àsquelas observadas nas neuropatias periféricas em humanos (BESSON, 1999). Por essa razão, o desenvolvimento de novos modelos que permitam avaliar as alterações nociceptivas associadas com as lesões nervosas ainda é necessário.

1.2.1. Avulsão do plexo braquial

A lesão do plexo braquial em indivíduos adultos normalmente é caracterizada por uma lesão fechada (sem exposição) e, é, em grande parte, resultante de tração considerável do ombro. Este tipo de lesão tem-se tornado um problema clínico comum, ao contrário da lesão nervosa braquial obstétrica, onde os cuidados durante o parto vêm reduzindo o número de casos (RANKINE, 2004). Acidentes de motocicleta constituem a causa mais comum de lesão do plexo braquial, seguido de acidentes automobilísticos e atropelamentos (GARCIA-MARCH et al., 1987; MOSSY e NASHOLD, 1988; WAIKAKUL et al., 2000). Há predomínio de pacientes do sexo masculino e com idade inferior a 35 anos, o que é justificado pelo fato de esses indivíduos participarem de atividades mais freqüentemente associadas com acidentes graves (WYNN PARRY, 1970; WAIKAKUL et al., 2000).

Avanços recentes nas técnicas cirúrgicas têm criado expectativa de melhora nos pacientes com este tipo de lesão. As opções cirúrgicas incluem enxerto de nervo, transplante e, mais recentemente, de implantação de raiz na medula espinhal (CARLSTEDT et al., 2000). Entretanto, a escolha da realização de procedimentos cirúrgicos depende do nível da lesão e da rapidez para o diagnóstico correto.

O plexo braquial é formado, como demonstrado na Figura 3, pelos ramos anteriores dos nervos espinhais das 4 últimas vértebras cervicais (C5 – C8) e da primeira torácica, T1. Os nervos espinhais derivam das raízes dorsais e ventrais que

surgem da medula espinhal. As raízes dorsais carreiam as fibras sensoriais que se originam em gânglios da raiz dorsal e as raízes ventrais contêm as fibras com funções motoras. Os ramos espinhais dão origem a 3 troncos (tronco superior, médio e inferior) que se ramificam e entrecruzam formando os fascículos lateral, posterior e medial. Estes fascículos, por sua vez, dão origem aos nervos que irão inervar as áreas laterais, posteriores e mediais do ombro, braço, antebraço e mão. Com isto, os nervos originados do plexo braquial são plurissegmentares, ou seja, contêm fibras originadas em mais de um segmento medular (MACHADO, 2000).

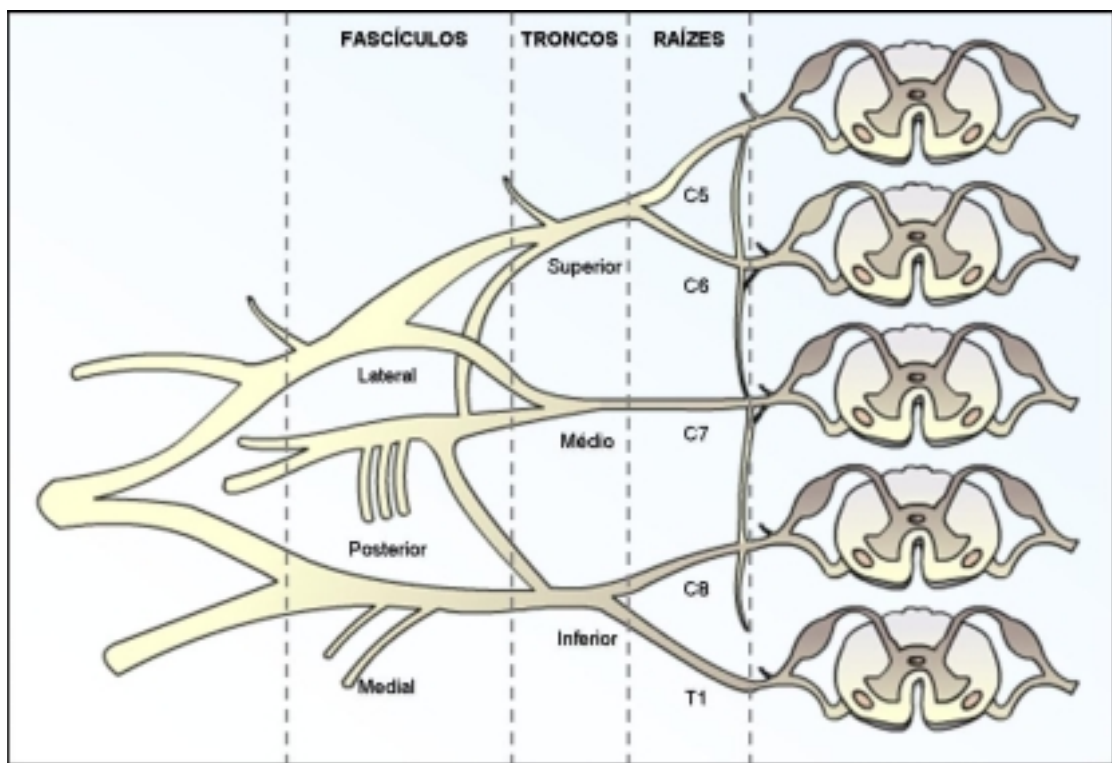


Figura 3. Representação esquemática da formação anatômica do plexo braquial.
Adaptado de MACHADO (2000).

A lesão por avulsão do plexo braquial (APB), como mencionado anteriormente, é um evento comum em humanos, podendo levar à importantes alterações patológicas responsáveis pela indução e estabelecimento de dor neuropática (CARVALHO et al.,

1997). Segundo Wynn Parry (1980), a dor por deaferentação é uma das mais significantes razões de incapacidade. Ele observou que 98 dos 108 pacientes que apresentavam APB, referiam dor significativa durante o período pós-traumático (WYNN PARRY, 1980). A lesão do plexo braquial é causada pela avulsão da raiz medular, que produz dor característica constante, intermitente e freqüentemente intratável (BERMAN et al., 1998; ANAND e BIRCH, 2002). A dor geralmente acomete a projeção do ombro e região supra-escapular com irradiação para o membro superior ipsilateral, dependendo da intensidade e da região do plexo lesado. Além de ser causada por trauma físico, a lesão do plexo braquial pode ser idiopática, de caráter familiar, induzida por certas posições do membro superior, além de compressões, procedimentos anestésicos ou pós-radioterapia.

Os sintomas incluem distúrbios da sensibilidade superficial como parestesias e déficits motores associados às alterações dos reflexos miotáticos. A exaustão física, bem como situações de ansiedade e depressão, costumam agravar o desconforto. Na casuística de Wynn Parry, o início da dor ocorre imediatamente após o traumatismo em 60 % dos pacientes e nos demais, nas primeiras 12 semanas. Além disso, a presença de zonas de gatilho distantes da área deaferentada, no hemicorpo ipsi ou contralateral, também foi descrita (WYNN PARRY, 1984). A dor induzida pela APB é conhecida por ser aguda, violenta, e intermitente, sem tratamento eficaz (ANAND e BIRCH, 2002). Este tipo de lesão pode desencadear uma plasticidade exacerbada do SNC que está associada com esta sensibilidade dolorosa alterada (CARVALHO et al., 1997).

O tratamento dos pacientes com APB utilizando as terapias disponíveis é freqüentemente insatisfatório (WYNN PARRY, 1970). O emprego de técnicas de reabilitação física, interações psicossociais, terapia ocupacional, psicoterapia e o retorno precoce às atividades habituais são importantes e, aparentemente, melhoram o

rendimento funcional e o ajuste psicossocial podendo reduzir a frequência de dor crônica. Porém a dor, quando presente, é comumente refratária às drogas analgésicas disponíveis no mercado.

A APB foi descrita recentemente em ratos como um novo modelo de dor neuropática persistente (RODRIGUES-FILHO et al., 2003). As principais características da dor decorrente da APB são rápido estabelecimento (1º dia pós-lesão) e o desenvolvimento de dor neuropática persistente (meses ou anos), evidenciada em locais distantes da lesão (WYNN PARRY, 1984; RODRIGUES-FILHO et al., 2003). As causas destas alterações ainda não foram elucidadas e não se sabe ao certo quais mecanismos estão envolvidos na dor neuropática induzida pela APB.

1.2.2. Mecanismos envolvidos na dor neuropática

Como mencionado anteriormente, no momento da lesão nervosa, alguns componentes da resposta inflamatória são liberados (TRACEY e WALKER, 1995), provavelmente como resultado da remoção dos axônios ou das células de Schwann destruídas. Estas células, por sua vez, podem causar a liberação de mediadores que sensibilizam as fibras sensoriais (TRACEY e WALKER, 1995; BENNETT, 1999). Sabe-se que esta sensibilização sensorial pode induzir ainda a liberação de citocinas pró-inflamatórias por células imunes ativadas. Há uma infiltração maciça e rápida de macrófagos que liberam citocinas pró-inflamatórias no sítio da lesão, bem como as células de Schwann e a micróglia (WATKINS et al., 1995).

Dados demonstram que na primeira semana após a lesão de nervo periférico, o processo de reorganização dentro dos neurônios sensoriais lesionados produz um aumento pronunciado no transporte axonal retrógrado de pequenas proteínas, tais como citocinas e fatores neurotróficos (SHUBAYEV e MYERS, 2001; CAHILL et al.,

2003). Por outro lado, os fatores neurotróficos são capazes de modular a expressão de outras proteínas, tais como os receptores B₁ e B₂ para cininas (LEE et al., 2002).

Diante destes fatos, e devido à carência de conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos nas alterações hipernociceptivas observadas após a APB, este estudo visou investigar se as mesmas contam com o envolvimento da citocina TNF- α , dos fatores neurotróficos e dos receptores B₁ e B₂ para cininas após a APB em camundongos.

1.2.2.1. *TNF α e dor neuropática*

Evidências experimentais recentes revelaram que citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas nas alterações induzidas pela lesão de nervo periférico, sendo que as mesmas parecem contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento da dor neuropática (SOMMER, 2001; STOLL et al., 2002). O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma importante citocina produzida por muitos tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos, queratinócitos e fibroblastos, em resposta à inflamação, à infecção, à lesão tecidual e a outras alterações ambientais. Esta citocina foi identificada em meados de 1970 por Lloyd Old e colaboradores (CARSWELL et al., 1975) como um fator sorológico induzido por endotoxina que era capaz de causar a necrose de certos tumores murinos *in vivo*. O TNF α derivado de produtos bacterianos foi primeiramente isolado em 1984 e, ao longo das últimas décadas, vários estudos têm identificado uma superfamília de ligantes e receptores para TNF α (PAUL et al., 2006).

O TNF α é uma proteína homotrimérica, inicialmente identificada como uma proteína secretada de 17 kDa. Mais tarde, foi demonstrado que o TNF α pode existir como proteína de membrana com peso molecular de 27 kDa na sua forma não-clivada (PEREZ et al., 1990). O TNF- α exerce seus efeitos através de dois receptores distintos,

denominados “p55” (TNFR1) e “p75” (TNFR2) (VANDENABEELE et al., 1995). A exposição das células ao TNF- α pode resultar na ativação de uma cascata de caspases resultando em apoptose celular, através da ativação do receptor “p75”. Por outro lado, quando se liga ao receptor “p55”, o TNF- α causa ativação de dois fatores de transcrição nuclear, o AP-1 e o NF- κ B, que por sua vez, induzem a síntese de várias proteínas envolvidas nas respostas inflamatórias e nociceptivas agudas e crônicas (BARNES e KARIN, 1997). O TNF- α é um fator fundamental na regulação do balanço entre a ativação de vias de sinalização pró- e anti-apoptótica no controle da proliferação celular e na resposta inflamatória. De modo interessante, a supressão da apoptose geralmente resulta em resposta inflamatória (BAUD e KARIN, 2001). O TNF- α é descrito como o maior modulador das primeiras alterações degenerativas durante a lesão de nervo periférico (SHAMASH et al., 2002). Ademais, estudos indicam que o TNF α é capaz de induzir lesão axonal, recrutamento de macrófagos, e atividade ectópica em nervos periféricos (PERKINS e TRACEY, 2000; SCHÄFERS et al., 2003; GEORGE et al., 2005). Tem sido sugerido que o receptor “p55” (TNFR1) está implicado no surgimento de hipernocicepção mecânica e térmica após a constrição do nervo ciático (SOMMER et al., 1998a). Terapias utilizando anticorpo anti-TNF- α são capazes de reduzir a hipernocicepção induzida por diferentes modelos de mononeuropatia, tais como constrição crônica do nervo ciático e transecção parcial do nervo ciático (LINDENLAUB et al., 2000; SCHÄFERS et al., 2001, SOMMER et al., 2001a).

1.2.2.2. Fatores neurotróficos e dor neuropática

A palavra “trófico” é derivada do grego *trophikos*, que significa nutrição. A palavra “neurotrófico” quer dizer “nutrição neuronal”. Atualmente, a palavra

“neurotrófico” é aplicada ao grupo de substâncias (normalmente proteínas) que promovem a sobrevivência neuronal (APFEL, 1999). Os fatores neurotróficos fazem parte de uma pequena família de proteínas diméricas que afetam todos os aspectos biológicos neuronais, incluindo tanto a sobrevivência quanto o crescimento dos neurônios motores e sensoriais (para revisão ver: POO, 2001). Além do mais, os fatores neurotróficos podem também regular e direcionar o crescimento de dendritos e axônios, a estruturação sináptica, a liberação de neurotransmissores, a indução de LTP (potencialização de longo prazo) e, o mais importante, possibilitar a plasticidade sináptica (MCALLISTER et al., 1995; POO, 2001). Durante algumas décadas, muitos fatores neurotróficos foram descobertos e caracterizados, incluindo o NGF (fator-de-crescimento-neuronal), seguido pelo NT-3 (neurotrofina-3), GDNF (fator-neurotrófico-derivado-de-células-da-glia) e BDNF (fator-neurotrófico-derivado-do-cérebro), entre outros (SAH et al., 2003). As ações dos fatores neurotróficos NGF, NT-3 e BDNF dependem de dois tipos de receptores transmembranares, os receptores Trk's ou o receptor $p75^{NTR}$. Os receptores Trk's são receptores tirosina-quinase com domínios intracelulares conservados que ativam vias de sinalização bem estabelecidas (KAPLAN e MILLER, 2000). O fator neurotrófico GDNF também atua através de um receptor do tipo tirosina-quinase, o receptor Ret, que forma um complexo com um receptor da família do GDNF ligado ao glicosilfosfoinositol- α ($GFR\alpha$) (ROSENTHAL, 1997). Estes fatores, em conjunto com os receptores com os quais interagem, têm sido apontados como uma classe de alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas para o controle da dor neuropática (THOENEN e SENDTNER, 2002; SAH et al., 2003).

O primeiro fator neurotrófico a ser descoberto foi o NGF no início dos anos 50. Estudos subseqüentes identificaram este fator como sendo uma proteína formada de 2 cadeias peptídicas idênticas ligadas, cada uma contendo 118 aminoácidos, que integra

um grande complexo protéico chamado 7S NGF (COHEN, 1960). Durante o desenvolvimento, o NGF é sintetizado e liberado pelos tecidos alvo, ligando-se subsequente a seus receptores nos terminais nervosos, resultando na sobrevivência e diferenciação neuronal. Os receptores para o NGF incluem o TrkA, também chamado de NTrkA, e o receptor p75^{NTR} de menor afinidade (JOHNSON et al., 1986). Entretanto, através da formação de heterodímeros, o TrkA e o p75^{NTR} podem aumentar a afinidade da ligação ao NGF.

Alguns anos após a descoberta do NGF, a atividade neurotrófica foi observada em meio de condicionamento glial, a qual não foi inibida pelo anticorpo contra o NGF. Esta substância foi purificada de cérebros de porco e chamada de BDNF (fator neurotrófico-derivado-do-cérebro) (BARDE et al., 1982). A análise estrutural demonstrou que há aproximadamente 50 % de homologia entre o BDNF e o NGF, sugerindo que ambos fazem parte da mesma família genética (LEIBROCK et al., 1989). O BDNF é sintetizado por uma sub-população de neurônios sensoriais primários e é transportado anterogradamente aos terminais centrais na medula espinhal. Entre as neurotrofinas, o BDNF é o mais abundante em distribuição no SNC. Em neurônios sensoriais primários, o mRNA para o BDNF e a proteína estão presentes em uma sub-população de células do DRG. O BDNF é encontrado basicamente em neurônios de pequeno e médio diâmetro, predominantemente aqueles que contêm neuropeptídeos, tais como SP e CGRP. O aumento na síntese de BDNF parece ser devido aos efeitos do NGF (PEZET et al., 2002).

O BDNF exerce seus efeitos através da ativação do receptor TrkB ou do receptor p75^{NTR}, formando homodímeros ou heterodímeros. Na realidade, a afinidade do BDNF pelo receptor TrkB é baixa, entretanto, quando forma heterodímero com o receptor p75^{NTR} esta afinidade aumenta (CHAO, 2003).

A neurotrofina NT-3 exerce um papel essencial na sobrevivência neuronal sensorial e simpática durante o período de desenvolvimento (SNIDER, 1994). De maneira semelhante a outras neurotrofinas, a NT-3 é expressa em tecidos não-neuronais periféricos, tais como a vasos e diferentes órgãos que recebem inervação simpática. A neurotrofina NT-3 é capaz de ativar os receptores TrkA e TrkB, em adição ao seu receptor preferencial TrkC e o receptor $p75^{NTR}$ (FRANCIS et al., 1999; KURUVILLA et al., 2004).

Outra família de fatores neurotróficos que tem sido implicada na dor neuropática é o GDNF. O GDNF foi descoberto como um potente fator neurotrófico para neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo por Li e colaboradores (1993). Suas ações são desempenhadas através da ativação de um complexo de receptores Ret-GFR α , como citado anteriormente (SAH et al., 2003). Encontra-se expresso em muitas áreas do SNC durante o desenvolvimento e na fase adulta. Além de atuar sobre neurônios dopaminérgicos, o GDNF afeta outros neurônios ou glia da substância negra (LIN, 1996) e neurônios motores (HENDERSON et al., 1994). O GDNF também é expresso em diferentes órgãos, como rins (SUVANTO et al., 1996) e trato gastrointestinal (HELLMICH et al., 1996).

1.2.2.3. Cininas e dor neuropática

As cininas constituem uma importante família de peptídeos biologicamente ativos envolvidos em diversos efeitos biológicos incluindo a homeostasia cardiovascular, inflamação e nocicepção (para revisão ver: CALIXTO et al., 2000; 2001; 2004; CAMPOS et al., 2006; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; MOREAU et al., 2005). Estes peptídeos estão entre os primeiros mediadores a serem liberados nos tecidos

lesionados, sendo originados a partir da clivagem dos cininogênios (de alto e baixo peso molecular) pela calicreína plasmática, a qual é ativada precocemente na cascata de coagulação ou, pela calicreína tecidual, que por sua vez é ativada por proteases liberadas no sítio da lesão (REGOLI e BARABÉ, 1980; VAVREK e STEWART, 1985; MURRAY et al., 1990; REGOLI et al., 1990; BEAUBIEN et al., 1991; BHOOLA et al., 1992; REGOLI et al., 1994; para revisão ver: HALL e MORTON, 1997).

Os estudos do sistema cininérgico, em conjunto com a descoberta da calicreína, tiveram início em 1909 com Abelous e Bardier. Entretanto, foi em 1949 que Rocha e Silva e colaboradores descreveram os efeitos hipotensores e contracturante de uma substância liberada do plasma frente à exposição ao veneno *Bothrops jararaca* ou à tripsina. Por produzir uma resposta contrátil lenta em relação à histamina e à acetilcolina, quando avaliada em preparações de íleo isolado de cobaia, esta substância foi denominada de bradicinina (do grego: *bradys* para lento; *kinesia* para movimento). A bradicinina foi purificada em 1956 (Andrade e Rocha e Silva, 1956) e sintetizada em 1964 por Boissonnas e colaboradores. Juntamente com o advento da bradicinina sintética surgiram novos trabalhos objetivando caracterizar as ações biológicas das cininas.

A cascata de formação das cininas compreende mecanismos já bem caracterizados. A ação da calicreína plasmática sobre o cininogênio de alto peso molecular, resulta na formação do nonapeptídeo bradicinina (BK). Por outro lado, a calicreína tecidual atuando sobre os cininogênios de baixo peso molecular, origina o decapeptídeo, calidina (lisil-BK). A calidina pode ser convertida em BK através da clivagem da porção N-terminal por aminopeptidases plasmáticas (GUIMARÃES et al., 1973).

As cininas desempenham seus efeitos através da ativação de dois receptores de membrana específicos, denominados B₁ e B₂. A classificação dos dois subtipos de receptores teve origem em estudos farmacológicos conduzidos no final da década de 70, que determinaram a ordem de potência dos agonistas cininérgicos em preparações de órgãos isolados (REGOLI e BARABÉ, 1980). Assim, os receptores do tipo B₁ são ativados preferencialmente pela des-Arg⁹-BK e pela Lys-des-Arg⁹-BK, enquanto que os receptores B₂ são praticamente insensíveis a estes metabólitos. Por outro lado, os receptores B₂ apresentam alta afinidade pela BK e pela Lys-BK, ao passo que os peptídeos produzidos pela ação da cininase I são praticamente inativos neste receptor (para revisão ver: MOREAU et al., 2005).

Os receptores para cininas apresentam uma estrutura com 7 domínios transmembranares, geralmente acoplados a proteína G α q/11 (PRADO et al., 2002; BLAUKAT, 2003). Apesar do número de aminoácidos ser semelhante (o receptor B₂ humano possui 359 aa enquanto o receptor B₁ possui 353 aa), a homologia entre os dois receptores é baixa, de aproximadamente 36% (MENKE et al., 1994). A principal diferença entre os receptores B₁ e B₂ está relacionada com o padrão de expressão destas duas moléculas. Tem sido demonstrado que grande parte das ações fisiológicas das cininas é mediada pela ativação dos receptores B₂, enquanto que os receptores B₁ são responsáveis por amplificar e perpetuar a sinalização, iniciada pela estimulação dos receptores B₂. As respostas mediadas pela ativação de ambos os receptores são qualitativamente similares e geralmente envolvem a ativação dos mesmos tipos celulares (MARCEAU et al., 1998; CALIXTO et al., 2000; 2001; 2004; CAMPOS et al., 2006; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Desta forma, os receptores B₂ são expressos de forma constitutiva em tipos celulares (DENDORFER et al., 1999), enquanto que os receptores B₁ normalmente não estão presentes em condições normais, mas sua

expressão pode ser aumentada após traumas teciduais ou durante alterações patológicas (MARCEAU et al., 1998; AHLUWALIA e PERRETTI, 1999; CALIXTO et al., 2000). Outro aspecto interessante é que após a ativação, os receptores B₂ são auto-fosforilados e internalizados. Em contrapartida, os receptores B₁ não são associados com processos de auto-fosforilação, internalização ou dessensibilização após a estimulação com agonista (SABOURIN et al., 2002).

A produção das cininas é crítica para o início da dor e exacerbação da sinalização sensorial responsável pelos processos de hiperalgesia e alodínia. Além do mais, as cininas são responsáveis por muitos sinais da inflamação, incluindo o aumento no fluxo sangüíneo e edema tecidual, bem como a liberação de muitos mediadores tais como prostanóides e citocinas (LEVINE et al., 1993; CRUWYS et al., 1994; DRAY e PERKINS, 1997; PESQUERO et al., 2000; COUTURE et al., 2001; MOREAU et al., 2005). A bradicinina é conhecida como um dos mais potentes agentes algogênicos (ARMSTRONG, 1970; LEVINE et al., 1993; DRAY e PERKINS, 1997) e alguns estudos têm demonstrado o importante papel das cininas e seus receptores na indução da dor neuropática.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Adaptar o modelo de APB a camundongos, bem como analisar, através da utilização de antagonistas seletivos, de anticorpos, técnicas de biologia molecular e utilização de animais com deleção gênica, alguns dos mecanismos envolvidos na gênese e na manutenção das respostas hipernociceptivas características do modelo.

2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- Avaliar o limiar mecânico das patas dianteiras e da pata traseira direita, bem como o avaliar o limiar térmico da pata direita traseira e da cauda de camundongos Swiss submetidos à APB;
- Verificar a atividade locomotora, desempenho motor e ganho de peso dos camundongos Swiss submetidos à APB;
- Investigar o envolvimento da citocina $\text{TNF}\alpha$ nas respostas hipernociceptivas induzidas pela APB em camundongos através da utilização de animais com deleção gênica para o receptor p55 do $\text{TNF}\alpha$, bem como da utilização de anticorpo anti- $\text{TNF}\alpha$ ou da talidomida;
- Analisar o papel dos fatores neurotróficos na gênese e na manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB através da utilização de anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-GDNF ou anti-BDNF;
- Investigar o envolvimento dos receptores B_1 e B_2 para cininas nas respostas hipernociceptivas induzidas pela APB através da utilização de camundongos com deleção gênica para os receptores cininérgicos, ou da utilização de

antagonistas seletivos para cada um dos receptores, bem como investigar alterações quanto à expressão do receptor B₁ e B₂ para cininas na medula espinhal e diferentes estruturas do cérebro (hipotálamo, tálamo, hipocampo e cortex) através da técnica de Western Blot e da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeos Swiss (pesando entre 20 e 28 g), criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Em alguns experimentos foram utilizados camundongos fêmeos com deleção gênica para o receptor p55 do $\text{TNF}\alpha$ ($\text{TNF}\alpha$ p55^{-/-}), obtidos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e camundongos com deleção gênica para os receptores B₁ e B₂ para cininas (B₁R^{-/-} e B₂R^{-/-}, respectivamente), obtidos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais selvagens de linhagens semelhantes aos animais com deleção gênica foram utilizados como controle (para o receptor B₁ linhagem J129, para o receptor B₂ linhagem C57/BL6 e para o receptor p55 do $\text{TNF}\alpha$ linhagem C57/BL6).

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, 60 a 80% de umidade), em ciclo 12 h claro/12 h escuro, com água e ração fornecidos *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos testes farmacológicos, realizados geralmente entre 8 e 17 h, a temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os experimentos descritos foram conduzidos de acordo com as diretrizes atuais de cuidados com os animais de laboratório e com as diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina aprovou todos os procedimentos experimentais (número de protocolo 262/CEUA e 23080.035334/2003-16/UFSC). O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo utilizado foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos com as drogas.

3.2. Procedimento cirúrgico para a avulsão do plexo braquial

A metodologia utilizada para a realização da APB foi similar àquela descrita para ratos (RODRIGUES-FILHO et al., 2003) e adaptada para camundongos (QUINTÃO et al., 2006). Primeiramente, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 7% (8 ml/kg; i.p.). O plexo braquial direito foi abordado através de uma incisão longitudinal paralela a clavícula, transcorrendo do esterno à região axilar (1 cm aproximadamente, Figura 4 A). Os vasos subclávios foram localizados e o tronco inferior foi dissecado (Figura 4 B – D). Um grupo de animais teve o tronco inferior pinçado e avulsionado por tração utilizando duas pinças cirúrgicas (Figura 4 E e F). No grupo falso-operado, o plexo braquial foi exposto e dissecado sem sofrer qualquer lesão. Por fim a pele do animal foi suturada utilizando fio de sutura de seda 4,0 (Ethicon, Edinburgh).

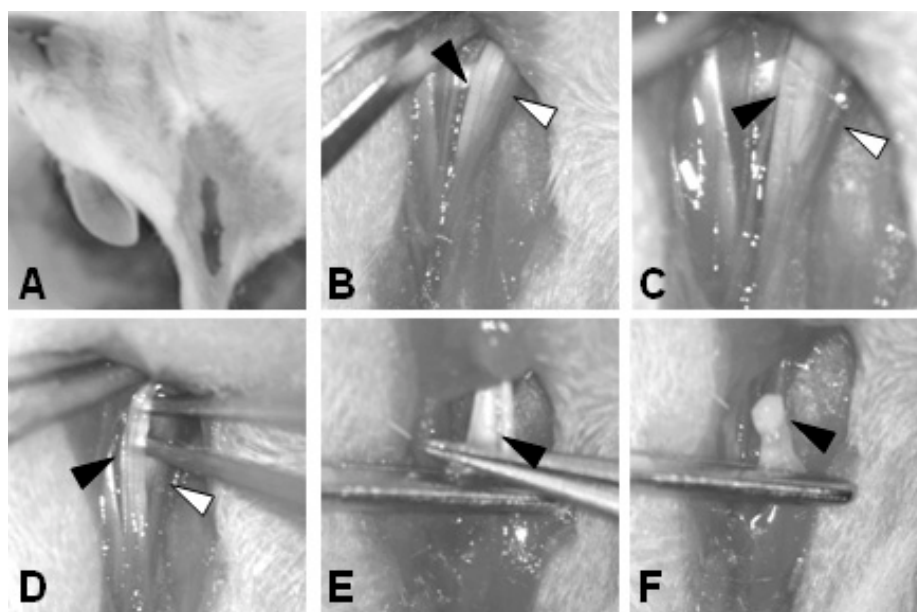


Figura 4 – Ilustração demonstrando os procedimentos cirúrgicos da APB. (A) Região da incisão, (B e C) anatomia do plexo braquial, (D) separação de nervos e vasos, (E) preensão do tronco inferior, (F) avulsão do tronco inferior. Tronco inferior do plexo braquial (setas pretas); vasos subclávios (setas brancas).

3.3. Análise do limiar mecânico através do filamento de von Frey

Para avaliar a hipernocicepção mecânica, os animais foram colocados individualmente em compartimentos de acrílico transparente individuais (9 X 7 X 11 cm) localizados em uma plataforma de arame elevada para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. Os animais foram aclimatizados por pelo menos 30 min antes dos testes comportamentais. A frequência de resposta de retirada foi obtida através de 10 aplicações (duração de 1 s cada) do filamento de von Frey 0,6 g (VFH, Stoelting, Chicago, USA). Os estímulos foram realizados na superfície plantar da pata traseira direita do animal. O filamento 0,6 g, por produzir em média 15 % de frequência de retirada da pata, foi utilizado durante todo o trabalho por ser considerado um valor adequado para a avaliação da hipernocicepção mecânica (BORTOLANZA et al., 2002; QUINTÃO et al., 2005). Para a avaliação do limiar mecânico das patas dianteiras do animal, foi realizada nova padronização dos filamentos para se obter respostas basais similares às obtidas nas patas traseiras com o filamento 0,6 g. Objetivando determinar o limiar mecânico basal (B), todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação pré-cirúrgica e novamente re-avaliados em diferentes tempos após a APB.

3.4. Análise do limiar térmico através do teste de retirada da cauda (*Tail-Flick*)

Uma fonte radiante de calor (Albarsch, Tail-Flick Analgesia Meter) foi utilizada para avaliar a latência de retirada da cauda, de acordo com a metodologia descrita por D'AMOUR e SMITH (1941). Todos os animais foram avaliados para determinar o limiar térmico basal (B) e submetidos à cirurgia, como descrito acima. A hipernocicepção térmica foi avaliada 4 dias após a avulsão. Vinte segundos foram adotados como tempo máximo de reação para evitar possíveis danos teciduais.

3.5. Análise do limiar térmico através do teste de retirada da pata (*Hargreaves*)

A técnica utilizada foi descrita por HARGREAVES et al. (1988), sendo que a intensidade do feixe luminoso foi adequada para não causar a retirada da pata dos animais controle num intervalo mínimo de tempo de 15 segundos. Os animais foram colocados em uma câmara de acrílico com fundo e lados transparentes (Plantar Test, Ugo Basile, modelo 7371), onde permaneceram durante 30 minutos antes do teste. Decorrido o tempo de adaptação dos animais ao ambiente, um feixe de luz previamente estabelecido foi incidido abaixo do fundo transparente e posicionado sob a pata posterior direita dos animais. A hipernocicepção térmica foi caracterizada como a retirada da pata dos animais dentro do tempo de 20 segundos. Objetivando determinar o limiar térmico basal (B), todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação pré-cirúrgica e novamente re-avaliados em diferentes tempos após a APB.

3.6. Atividade locomotora (campo aberto)

A atividade locomotora dos animais submetidos à APB foi avaliada através do teste do campo aberto como descrito previamente (RODRIGUES et al., 2002). O campo aberto consiste de uma arena circular de acrílico transparente, com 60 cm de diâmetro e borda de 50 cm de altura, com um piso dividido em 12 quadrantes. O número de cruzamentos realizados com as quatro patas foi quantificado durante uma sessão de 6 min. Os animais operados foram avaliados quanto à atividade locomotora no 4º e no 30º dia após a cirurgia.

3.7. Efeito sobre o desempenho motor (*rota-rod*)

O desempenho motor dos animais submetidos à APB foi avaliado através do teste do *rota-rod* conforme a metodologia descrita anteriormente (DUNHAM e MIYA,

1957). O aparelho de *rota-rod* (Ugo Basile, modelo 7600) consiste em um cilindro com 2,5 cm de diâmetro, subdividido em seis compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. O cilindro gira a uma velocidade constante de 22 rotações por minuto. Os camundongos foram selecionados 24 h antes dos experimentos conforme sua reatividade ao teste, sendo desprezados aqueles que não permaneceram 60 s no aparelho. Os animais operados foram avaliados quanto à atividade locomotora no 4º e no 30º dia após a cirurgia. Os resultados foram expressos como tempo (s) em que os animais permaneceram sobre o *rota-rod*. O tempo máximo utilizado foi de 60 s.

3.8. Avaliação do peso dos animais submetidos à APB

O peso dos animais foi verificado utilizando uma balança analítica (BEL Equipamentos Analíticos Ltda). Os animais operados e falso-operados foram avaliados no 4º e no 30º dia após a cirurgia.

3.9. Análise de alguns mecanismos envolvidos na gênese e na manutenção das respostas hipernociceptivas induzidas pela APB em camundongos

3.9.1. Participação da citocina TNF α

3.9.1.1. *Limiar mecânico e térmico de animais TNF α p55^{-/-} submetidos à APB*

O papel do TNF α na indução das respostas hipernociceptivas mecânica e térmica induzidas pela APB foram analisadas utilizando camundongos TNF α p55^{-/-} e camundongos selvagens C57/BL6. Primeiramente, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, como descrito anteriormente, e a hipernocicepção mecânica e térmica (tail-flick) foram avaliadas entre o 4º e o 80º dia após a avulsão. Este experimento foi composto de 4 grupos: C57/BL6-operado e falso-operado, e TNF α p55^{-/-}-operado e TNF α p55^{-/-}-falso-operado.

3.9.1.2. Efeito de estratégias anti-TNF α nas respostas hipernociceptivas induzidas pela APB

O próximo passo foi investigar o envolvimento do TNF α na hipernocicepção mecânica induzida pela APB, tratando os camundongos Swiss operados com o anticorpo anti-TNF α localmente por instilação (10 e 100 ng/sítio) ou sistemicamente (100 μ g/kg, i.v.), administrados no momento da cirurgia ou 4 dias após. Outros grupos de animais foram tratados com talidomida (30 mg/kg, s.c.) nos mesmos intervalos de tempo. A hipernocicepção mecânica foi avaliada como descrito previamente, em diferentes períodos após a avulsão. As doses do anticorpo e da talidomida foram selecionadas com base em dados da literatura ou em experimentos piloto (HATTORI et al., 1998; ARRUDA et al., 2004; ROCHA et al., 2005, 2006).

3.9.2. Participação dos fatores neurotróficos

3.9.2.1. Efeitos dos anticorpos anti-fatores-neurotróficos sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB

O envolvimento do NGF, NT-3, GDNF e BDNF no estabelecimento da hipernocicepção mecânica induzida pela APB foi investigado através do tratamento de camundongos Swiss operados com anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-GDNF ou anti-BDNF, administrados por via local (2 μ g/sítio), i.p. (100 μ g/kg), i.t. (0,5 μ g/sítio) ou i.c.v. (0,5 μ g/sítio) no momento da cirurgia. Os animais foram avaliados quanto à hipernocicepção mecânica uma vez ao dia, a partir do 1º dia após a cirurgia. Para investigar a participação dos fatores neurotróficos na manutenção da resposta hipernociceptiva após a APB, outros grupos de animais foram tratados com os diferentes anticorpos contra NGF, NT-3, GDNF ou BDNF por via i.p. (100 μ g/kg), i.t.

(0,5 µg/sítio) ou i.c.v. (0,5 µg/sítio) no quarto dia após a cirurgia. O limiar mecânico foi avaliado em diferentes períodos após os tratamentos. As doses dos anticorpos foram selecionadas com base em dados da literatura ou em experimentos piloto (GWAK et al., 2003; FERREIRA et al., 2005b; SHELTON et al., 2005).

3.9.3. Participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas

3.9.3.1. *Limiar mecânico e térmico de animais B₁R^{-/-} e B₂R^{-/-} submetidos à APB*

A relevância do receptor B₁ e B₂ para cininas para a indução da hipernocicepção mecânica e térmica (tail-flick) após a BPA foi inicialmente analisada utilizando animais B₁R^{-/-} e B₂R^{-/-} e seus respectivos camundongos controle (J129 ou C57/BL6, respectivamente). Primeiramente, os animais foram submetidos à APB como descrito anteriormente e a hipernocicepção mecânica e térmica (tail-flick) foram avaliadas por até 80 dias após a cirurgia. Cada experimento contou com pelo menos 3 grupos experimentais: selvagem-operado e selvagem-falso-operado e B₁R^{-/-}-operado ou B₂R^{-/-}-operado.

3.9.3.2. *Efeitos do antagonista seletivo para o receptor B₂ para cininas sobre a resposta hipernociceptiva induzida pela APB*

Neste grupo de experimentos, o envolvimento dos receptores B₂ para cininas na hipernocicepção mecânica induzida pela APB foi avaliada tratando os camundongos Swiss com o antagonista seletivo para o receptor B₂, o HOE-140, aplicado no momento da cirurgia ou 4 dias após, por diferentes vias de administração. Inicialmente, camundongos operados foram tratados localmente com HOE-140 (3 nmol/sítio), imediatamente após o procedimento cirúrgico. A hipernocicepção mecânica foi avaliada como descrito previamente, 4 dias após a APB. Em outro grupo experimental, o HOE-

140 (50 nmol/kg, s.c.) foi administrado sistemicamente no 4º dia pós-operatório e a hipernocicepção mecânica foi avaliada em diferentes intervalos de tempo após o tratamento. As doses do HOE-140 foram selecionadas com base nos dados da literatura (CORRÊA e CALIXTO, 1993).

3.9.3.3. Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B₁ sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB

O envolvimento dos receptores B₁ para cininas foi avaliado através da utilização de dois antagonistas seletivos para o receptor B₁, administrados em diferentes intervalos de tempo e por diferentes vias de administração. Primeiramente, camundongos Swiss operados foram tratados com o antagonista peptídico R-715 (60 nmol/sítio – local, 438 nmol/kg – i.p., 25 nmol/sítio – i.t. ou 25 nmol/sítio – i.c.v.) ou com o antagonista não-peptídico SSR-240612 (60 nmol/sítio – local, 390 nmol/kg – i.p., 25 nmol/sítio – i.t. ou 25 nmol/sítio – i.c.v.), ambos administrados no momento da cirurgia. A hipernocicepção mecânica foi avaliada como descrito anteriormente, a partir do 4º dia após a APB.

Em outro grupo experimental, os animais Swiss operados receberam o R-715 (438 nmol/kg – i.p., 25 nmol/sítio – i.t. ou 25 nmol/sítio – i.c.v.) ou SSR-240612 (390 nmol/kg – i.p., 25 nmol/sítio – i.t. or 25 nmol/sítio – i.c.v.), administrados no 4º dia após a cirurgia. Os animais que receberam os antagonistas por via i.t. ou i.c.v. no 4º dia após a APB também receberam outra dose no 10º dia para descartar possível processo de dessensibilização do receptor B₁.

Finalmente, um grupo adicional de animais Swiss operados foi tratado com o R-715 (438 nmol/kg – i.p., 25 nmol/sítio – i.t. ou 25 nmol/sítio – i.c.v.) ou com o SSR-240612 (390 nmol/kg – i.p., 25 nmol/sítio – i.t. ou 25 nmol/sítio – i.c.v.), administrados 30 dias após a cirurgia. A hipernocicepção mecânica foi avaliada como descrito

anteriormente em diferentes intervalos de tempo após o tratamento com as drogas. As doses do R-715 e do SSR-240612 foram selecionadas com base em dados da literatura ou experimentos piloto (FERNANDES et al., 2003; GOUGAT et al., 2004).

3.10. Vias de administração

3.10.1. Administração local

A administração local foi realizada instilando as drogas sobre o ramo do plexo braquial imediatamente após a sua avulsão e antes da sutura dos tecidos adjacentes (LINDENLAUB et al., 2000; SOMMER et al., 2001a).

3.10.2. Administração intratecal (i.t.)

A administração de drogas através da via i.t. foi realizada de acordo com o método descrito por HYLDEN e WILCOX (1980), com algumas modificações. As injeções foram realizadas em animais conscientes, a fim de eliminar a possível interferência de anestésicos. Uma agulha conectada a uma microseringa (25 µl), por intermédio de uma cânula de polietileno, foi inserida através da pele, fixando-se entre as vértebras no espaço subdural entre os segmentos espinhais L5-L6, para a administração de um volume de 5 µl das drogas ou veículo.

3.10.3. Administração intracerebroventricular (i.c.v)

A administração de drogas através da via i.c.v. foi realizada de acordo com o método descrito por LAURSEN e BELKNAP (1986). Os animais foram levemente anestesiados com éter e uma agulha (30 G; 4,2 mm de comprimento) conectada a uma microseringa (25 µl) por intermédio de uma cânula de polietileno foi inserida

diretamente no ventrículo lateral (coordenadas do bregma: 1 mm lateral; 1 mm rostral; 3 mm vertical) para a administração de um volume de 5 µl das drogas ou veículo.

3.11. Ensaios bioquímicos

3.11.1. Quantificação do RNA mensageiro para o receptor B₁ das cininas

3.11.1.1. *Ensaio de RT-PCR*

Com o objetivo de verificar o efeito da APB sobre a indução dos receptores B₁ para cininas, foram avaliados os níveis do RNAm para este receptor no tecido da medula e diferentes estruturas do cérebro de camundongos, coletados no 4º e no 30º dias após a cirurgia, através da técnica da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), conforme metodologia descrita por Campos et al. (2002) com algumas modificações. Nos intervalos de tempo descritos acima os animais foram sacrificados por decapitação. A medula e diferentes estruturas cerebrais (hipotálamo, tálamo, hipocampo e córtex) foram removidas em condições livres de RNase, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70 °C. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e o RNA total foi extraído utilizando reagente TRIzol (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A transcrição reversa (RT) foi realizada com 2 µg de RNA total, utilizando oligo dT como *primer* (0,05 µg), 50 U de transcriptase reversa, dNTP 144 µM, tampão de reação (DTT 10 mM, MgCl₂ 3 mM, KCl 75 mM e Tris-HCl 50 mM; pH 8,3) e 2 U de RNasin Plus, em um volume final de 12,5 µl. Para a obtenção do DNA complementar (DNAc) as amostras foram aquecidas por 5 min a 70 °C, resfriadas a 4 °C por 5 min e mantidas a 25 °C durante a adição da enzima RT. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 60 min, 70 °C por 5 min e resfriadas a 4 °C por 5 min. A amplificação do DNAc de seqüências específicas para o receptor B₁ de camundongo e para a β-actina foi obtida por PCR,

utilizando os seguintes *primers*: *sense* AACCGTTTCAACTGGCCC e *antisense* GACATAAATCAGTGGGTTC, para o receptor B₁; e *sense* TCCTTCGTTGCCGGTCCACA e *antisense* CGTCTCCGGAGTCCATCACA, para a β -actina. O DNAc da β -actina foi utilizado para a padronização da quantidade de RNA. Aliquotas de 2 μ l do RT foram adicionadas a um tampão contendo: Tris-HCl 10 mM (pH 9), MgCl₂ 1 mM, dNTP 200 μ M, 300 nM de cada *primer* e 5 U de *Taq* polimerase, em um volume final de 30 μ l. O ciclo do PCR foi o seguinte: 4 min a 94 °C, 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 53 °C para o receptor B₁ ou 45 s a 62 °C para a β -actina, 60 s a 72 °C e finalmente, 5 min a 72 °C. Aliquotas de 5 μ l de cada amostra foram analisadas em gel Tris/borato/EDTA (TBE)-poliacrilamida 6% e coradas com nitrato de prata. A análise quantitativa foi realizada pela medida da banda da β -actina. O tamanho das bandas foi de 609 pb para o receptor B₁ e 509 pb para a β -actina.

3.11.2. Expressão dos receptores B₁ e B₂ para cininas

3.11.2.1. *Preparação dos tecidos para o ensaio de Western Blot*

A medula espinhal de camundongos Swiss operados e falso-operados foram isolados no 4º dia após a cirurgia. Os tecidos foram homogeneizados em tampão A gelado [HEPES 10 mM (pH 7,4), contendo MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 5 μ g/ml, pepstatina A 5 μ g/ml, aprotinina 10 μ g/ml, ortovanadato de sódio 1 mM, β -glicerofosfato 10 mM, fluoreto de sódio 50 mM e ditioneitol 0.5 mM]. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 60 min. O *pellet* foi re-suspenso em 400 μ l de tampão A, contendo 0,1 % de Triton-X100 e incubado, sob agitação contínua, a 4 °C por 30 min. O extrato protéico foi então centrifugado por 30 min a 10.000 x g e o sobrenadante contendo a fração rica em membrana foi armazenado em freezer -70 °C até o momento de sua utilização. A determinação da concentração de proteína das

amostras foi realizada utilizando o *kit* Bio-Rad, segundo recomendações do fabricante (Bio-Rad, CA, USA). (FERREIRA et al., 2005b)

3.11.2.2. Ensaio de Western blot

Quantidades equivalentes de proteína foram adicionadas ao tampão Tris-HCl 65,5 mM (Tris 200 mM, glicerol 10 %, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 2,75 mM e azul de bromofenol 0,04 %), fervidas por 5 min e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) por eletroforese, de acordo com instruções do fabricante (GE Healthcare, SP, Brasil). As membranas foram bloqueadas em solução TBS-T (*Tris-buffered saline tween* 20) contendo leite em pó desnatado 10 % por 60 min em temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 2 h com os anticorpos para o receptor B₁ (sc-15048) ou receptor B₂ (sc-15051) (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluídos 1:100 em TBS. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados à peroxidase. Os imunocomplexos foram visualizados, utilizando o sistema de detecção por quimioluminescência (ECL, Amersham).

3.12. Drogas e reagentes

As seguintes drogas e reagentes foram utilizados: aprotinina, hidrato de cloral (Vetec; Brasil); azul de bromofenol, benzamidina, β -mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), ácido etileno diaminotetraacético (EDTA), glicerol, leupeptina, ácido n-[2-hidroxietil]piperazina-n'-[4-butanossulfônio (HEPES), pepstatina A, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), inibidor de tripsina da soja, tris, triton x-100, β -glicerofosfato, fluoreto de sódio, β -mercaptoetanol, anticorpo anti-NGF murino (lote 118H9095), pastilhas de

PBS (todos da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, E.U.A.); KCl, MgCl₂, tween 20 (todos da Merck, Alemanha); acrilamida, SDS (dodecil sulfato de sódio), temed, tris, TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA); transcriptase reversa (RT), dntp, RNAsin (Promega, Madison, EUA); taq polimerase (Ludwig Biotec, Porto Alegre, Brasil); talidomida (Tocris, Cookson Inc., MO, USA). anticorpo murino anti-TNF α (lote ct101), anticorpo anti-GDNF (lote afw03), anticorpo anti-NT-3 humano (lote uy02), anticorpo anti-BDNF humano (lote zq023121), goat IgG controle (es28) (R&D Systems Inc., Eua); r-175 (gentilmente doado pelo Prof. Domenico Regoli, University of Sherbrooke, CA, EUA); SSR-240612 (gentilmente doado pela Sanofi-Synthelabo Recherche, Paris, França); HOE-140 (Icatibant) (gentilmente doado pela Aventis, Frankfurt Am Main, Alemanha); APS (persulfato de amônio), azul de bromofenol (Usb, Nova Iorque, EUA); ortovanadato (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil, São Paulo, Brasil). Solução salina (0,9 %).

3.13. Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M., 95%). As porcentagens de inibição são citadas como a média \pm o erro padrão da média da diferença (em porcentagem) entre as áreas sob as curvas obtidas para cada experimento individual em relação ao grupo controle correspondente. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelos testes de Dunnett ou Newman-Keuls, ou através do teste *t* de *Student*, quando apropriado. Valores de *p* menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Todas as análises citadas acima foram realizadas utilizando o programa *GraphPad PRISM*[®].

4. RESULTADOS

4.1. Respostas hipernociceptivas induzidas pela APB em camundongos Swiss

Como observado na Figura 5, não houve diferença significativa entre os valores de limiar basal 'B' dos grupos de camundongos Swiss operados e falso-operados, avaliados quanto à sensibilidade mecânica e térmica. Porém, após a APB os camundongos desenvolveram uma hipernocicepção mecânica, evidenciada pela redução expressiva e duradoura do limiar mecânico de retirada da pata traseira direita após a estimulação com o VFH 0,6 g (por até 80 dias após a cirurgia), quando comparado com o grupo falso-operado ($p < 0,001$, Figura 5 A). Para avaliar a sensibilidade térmica dos animais, foram utilizados o teste de retirada da pata (Hargreaves) e o teste de retirada da cauda (Tail-flick). Como observado na Figura 5 B, a APB também foi capaz de induzir uma resposta hipernociceptiva térmica importante na pata traseira direita, que permaneceu significativa ($p < 0,05$) por até 14 dias após a cirurgia. Resultados semelhantes foram obtidos ao avaliar a sensibilidade térmica na cauda dos animais, com alteração significativa por até 14 dias após a APB ($p < 0,05$, Figura 5 C).

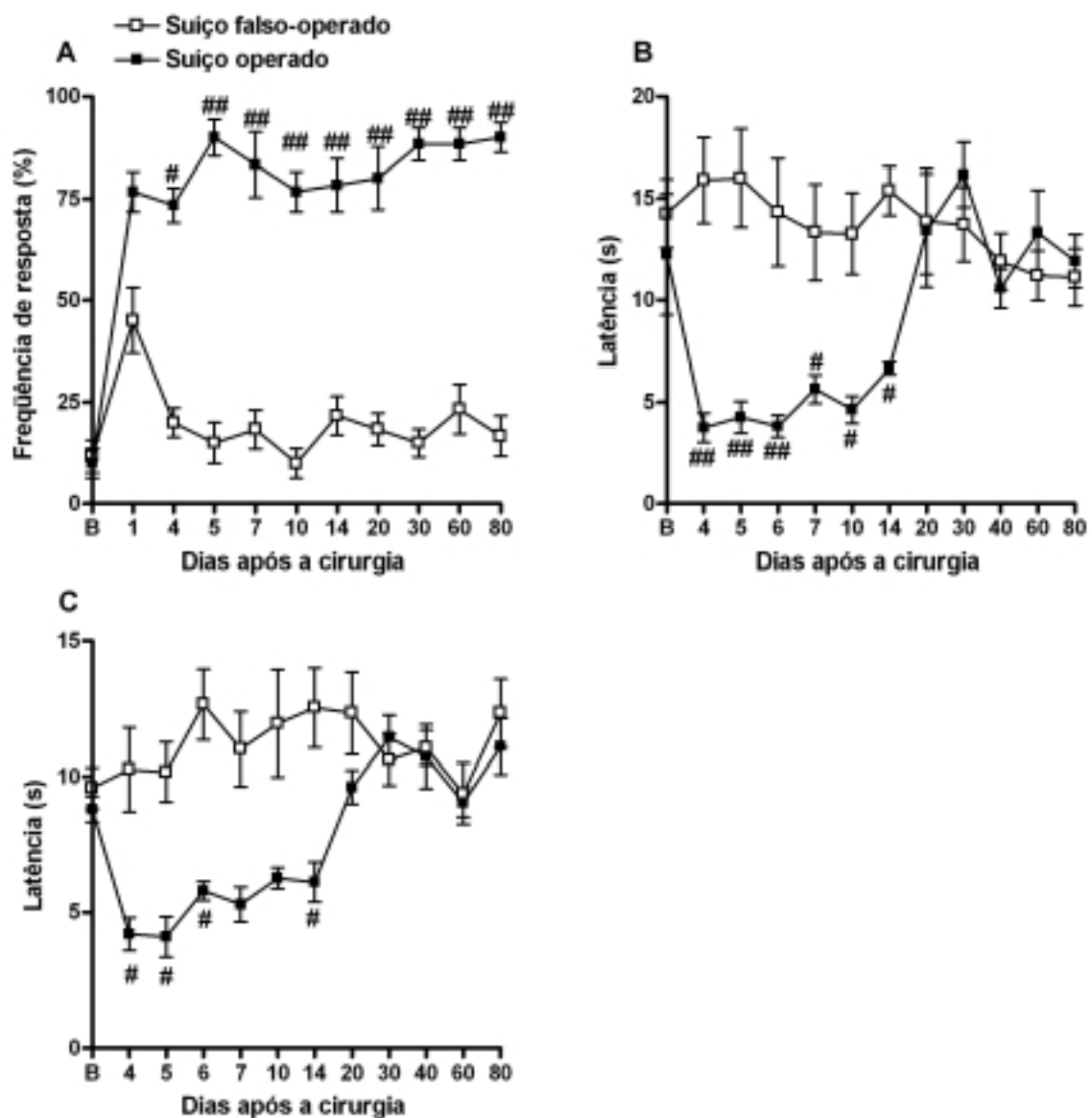


Figura 5 – Hipernociceção mecânica e térmica induzidas pela APB em camundongos Swiss. Limiar de retirada da pata direita traseira (A) ao estímulo mecânico, verificado através da aplicação do monofilamento de Von Frey 0,6 g, (B) latência de retirada da pata traseira após o estímulo térmico utilizando o teste de *Hargreaves* e (C) latência de retirada da cauda após o estímulo térmico utilizando o teste *Tail-flick*. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso operado (#), # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.2. Resposta hipernociceptiva nas patas dianteiras de camundongos Swiss submetidos à APB

Com o objetivo de verificar a existência de hipernocicepção mecânica primária, ou seja, no membro operado, ambas as patas dianteira direita e esquerda foram avaliadas. Primeiramente, foi realizada a padronização das respostas de retirada da pata dianteira induzida por diferentes VFH. Como se observa na Figura 6 A, o filamento 0,16 g mostrou-se mais adequado para avaliar a existência de hipernocicepção mecânica por causar aproximadamente 20 % de resposta de retirada. A Figura 6 B demonstra que a pata dianteira direita, submetida à APB, não respondeu de maneira significativa à estimulação com o VFH. Entretanto, quando se estimulou a pata dianteira esquerda, se obteve resposta em 82 ± 6 % das tentativas.

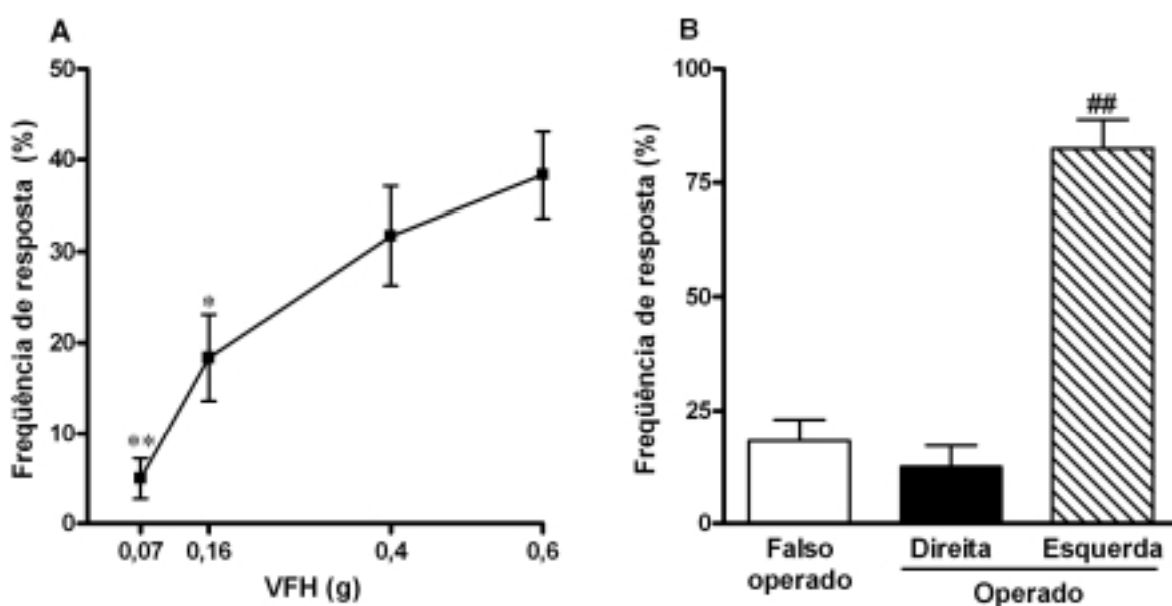


Figura 6 – Padronização da resposta hipernociceptiva mecânica nas patas dianteiras de camundongos submetidos à APB. (A) Padronização da frequência de retirada da pata dianteira em resposta a diferentes VFH. (B) Avaliação da hipernocicepção mecânica, através da estimulação com VFH 0,16 g, das patas dianteira direita e esquerda de animais submetidos à APB e animais falso-operados. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo estimulado com VFH 0,6 g * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, e difere do grupo falso operado ## $p < 0,01$. ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* Newman-Keuls.

4.3. Peso corporal, atividade locomotora e coordenação motora de camundongos

Swiss submetidos à APB

É importante salientar que os animais não apresentaram variações quanto ao ganho de peso corporal, quando comparados aos grupos *naïve* e falso-operado (26 ± 1 , 26 ± 1 e 25 ± 1 no 4º dia pós-operatório e, 31 ± 1 , 33 ± 1 e 32 ± 1 no 30º dia pós-operatório, para o grupo operado, falso-operado e *naïve*, respectivamente) (figura 7 A).

O teste de campo aberto foi realizado a fim de verificar possíveis alterações na capacidade de locomoção dos animais submetidos à APB. Como se pode observar, a APB não alterou de maneira significativa a atividade locomotora dos animais quando avaliados no 4º e no 30º dia após a cirurgia no teste do campo aberto. O número médio de cruzamentos foi de 129 ± 7 , 133 ± 5 e 141 ± 5 (no 4º dia pós-operatório) e 124 ± 8 , 138 ± 6 e 138 ± 8 (no 30º dia pós-operatório) para os grupos operado, falso-operado e *naïve*, respectivamente (Figura 7 B).

Para verificar o possível efeito da APB sobre a coordenação motora dos animais, utilizou-se o teste de rota-rod. A Figura 7 C demonstra que a APB não causou alteração significativa na coordenação motora dos animais quando avaliados no 4º dia após a cirurgia, entretanto, 30 dias após a APB os animais apresentaram déficit de coordenação motora significativo. Os resultados obtidos no teste de rota-rod foram 47 ± 7 s e 16 ± 4 s para o grupo operado avaliado no 4º e 30º dia após a cirurgia, versus 52 ± 7 s e 52 ± 7 s do grupo falso-operado avaliado no 4º e 30º dia após a cirurgia (Figura 7 C).

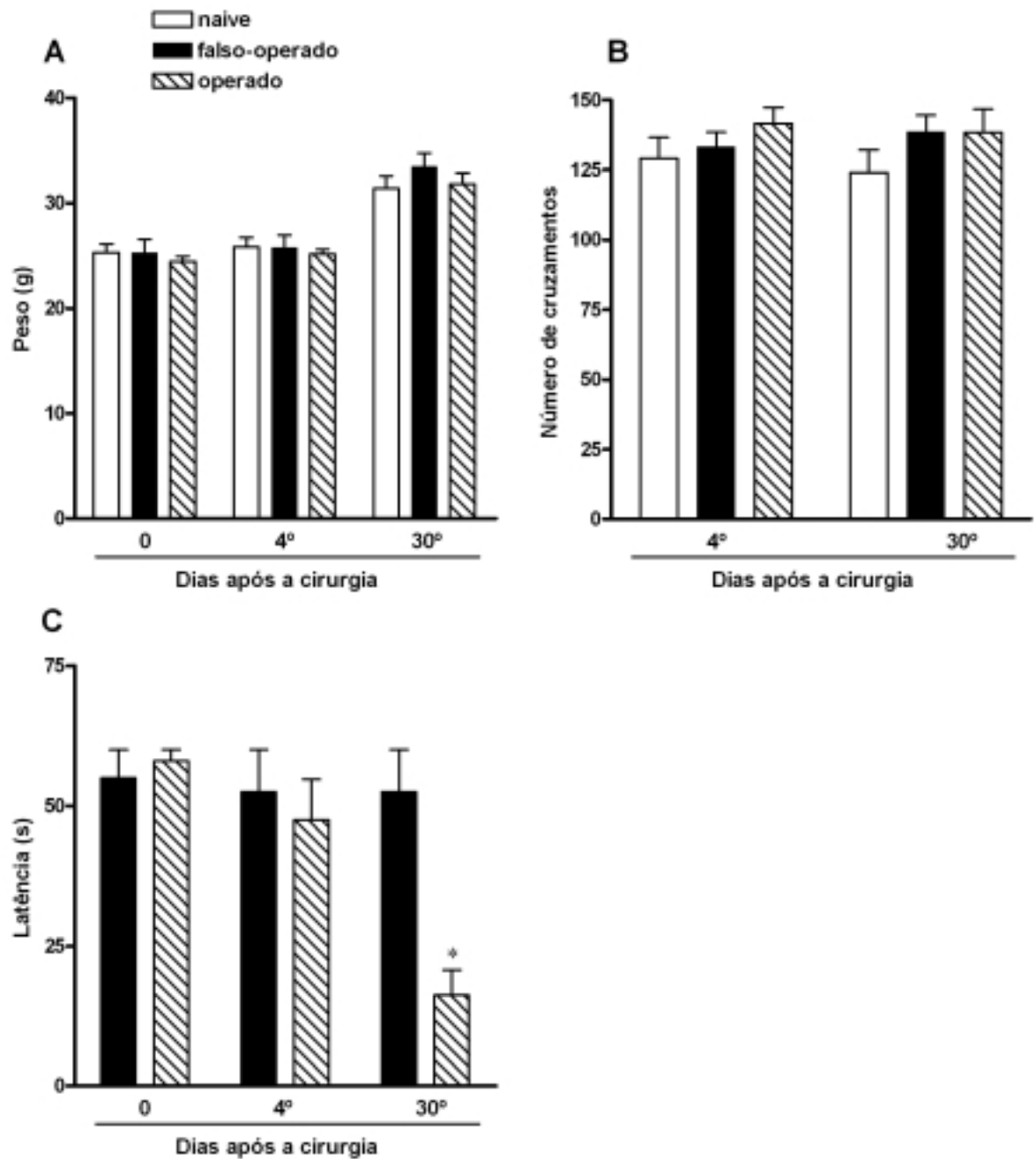


Figura 7 – (A) Peso corporal, (B) atividade locomotora e (C) coordenação motora de camundongos Swiss submetidos à APB. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$.

4.4. Análise dos diferentes mecanismos envolvidos na gênese e na manutenção das respostas hipernociceptivas induzidas pela APB em camundongos

4.4.1. Participação da citocina TNF α

4.4.1.1. *Limiar mecânico e térmico de animais TNF α p55^{-/-} submetidos à APB*

Os resultados da Figura 8 demonstram que a APB induziu redução significativa de ambos os limiares mecânico (Figura 8 A) e térmico (Figura 8 B) de retirada da pata traseira de camundongos selvagens da linhagem C57/BL6, quando comparados com o grupo de animais falso-operados, de maneira essencialmente similar aos dados descritos no item 4.1. para camundongos Swiss.

Quando camundongos TNF α p55^{-/-} foram submetidos a APB, não foi observado o desenvolvimento de hipernocicepção mecânica ($p < 0,001$) durante todo o período de avaliação (por até 80 dias após a cirurgia, Figura 8 A). Estes mesmos animais, quando submetidos ao teste de retirada da cauda, não apresentaram alteração no limiar térmico ($p < 0,01$), em comparação com os animais selvagens-operados (Figura 8 B).

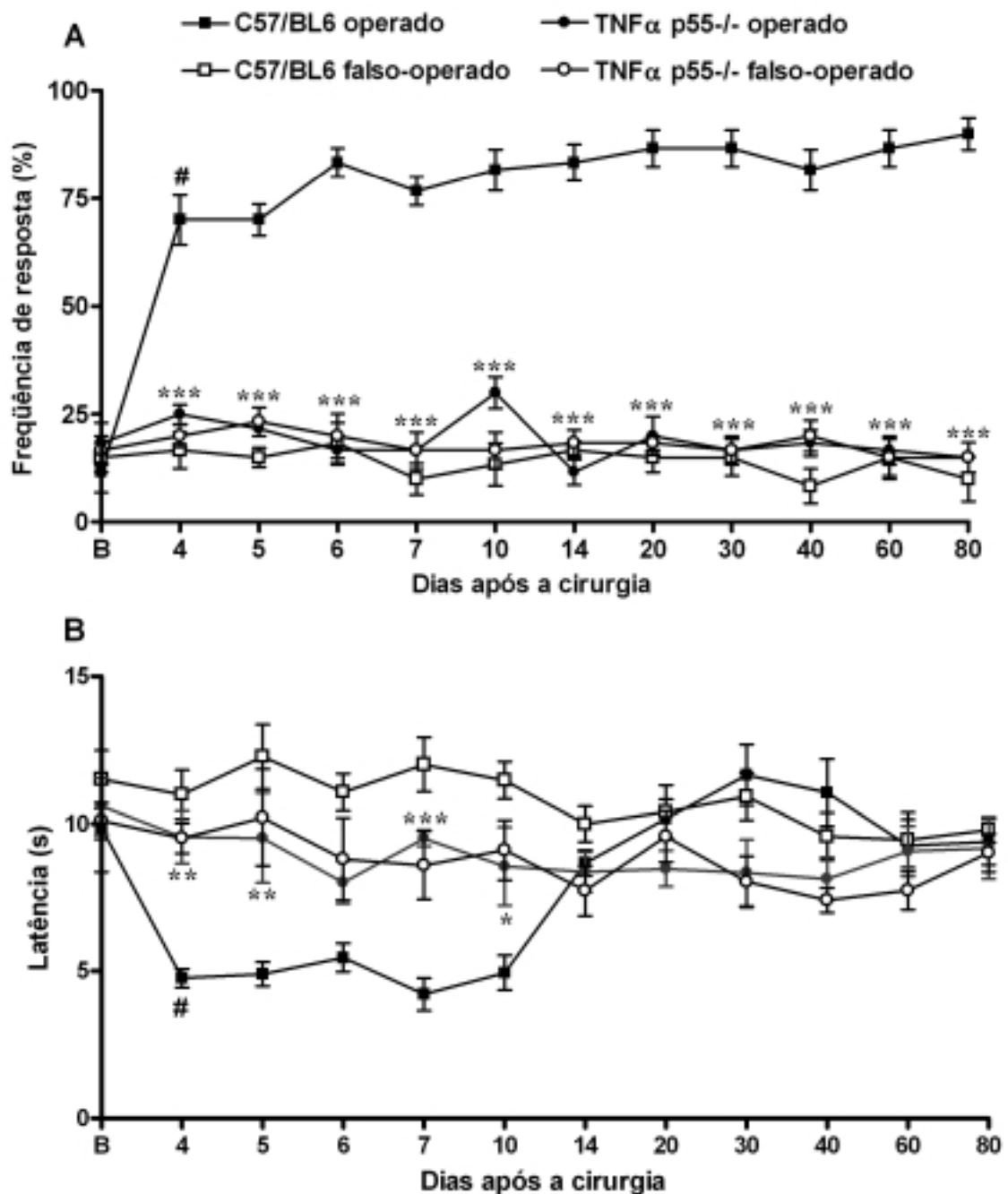


Figura 8 – Hipernociceção mecânica e térmica induzidas pela APB em camundongos com deleção gênica para o receptor p55 do TNF α . Hipernociceção mecânica (A - verificada através da aplicação do VFH 0,6 g) e térmica (B - latência de retirada da cauda através da aplicação de uma fonte radiante de calor) em animais C57/BL6 ou TNF α p55^{-/-} após a APB. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, n=4-6. Difere significativamente do grupo falso operado (#) $p < 0,001$, e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.4.1.2. Efeito do anticorpo anti-TNF α e da talidomida na indução da resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela APB em camundongos

Com a finalidade de avaliar o papel da citocina TNF α na gênese da hipernocicepção mecânica após a APB, um grupo separado de animais foi submetido à cirurgia e, antes da sutura dos tecidos, o anticorpo anti-TNF α (10 ou 100 ng/sítio) foi aplicado localmente. Os dados apresentados na Figura 9 demonstram que o anticorpo anti-TNF α , em ambas as doses administradas, foi capaz de prevenir o surgimento da hipernocicepção mecânica durante todo o período de avaliação (por até 80 dias após a cirurgia), com inibição de $93 \pm 1\%$ e $89 \pm 3\%$, para as doses de 10 e 100 ng/sítio, respectivamente.

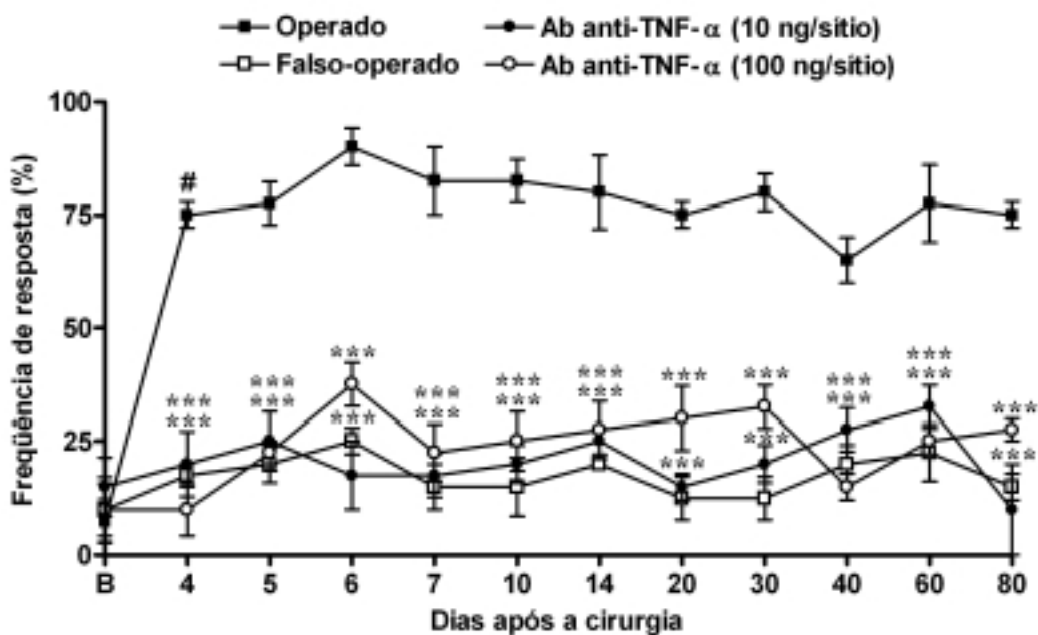


Figura 9 – Efeito do anticorpo anti-TNF α na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpo anti-TNF α (10 ou 100 ng/sítio) administrado no momento da cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso operado (#) $p < 0,001$, e difere significativamente do grupo operado *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

Em outra série de experimentos, o anticorpo anti-TNF α (100 μ g/kg, i.v.) foi administrado sistemicamente no momento da cirurgia. Como demonstrado na Figura 10, a hipernocicepção mecânica foi parcialmente reduzida até o 5º dia após a cirurgia, com inibição de 36 ± 5 %, quando comparado com o grupo operado tratado com PBS. Após este período, não foi observada nenhuma inibição significativa. O papel do TNF α também foi investigado através da utilização da talidomida, uma droga conhecida por inibir a síntese de TNF α , sem efeitos bem definidos para outras citocinas (George et al., 2000). Os dados da Figura 10 demonstram que o tratamento sistêmico com talidomida (30 mg/kg, s.c.), no momento da cirurgia, foi capaz de prevenir o surgimento da hipernocicepção mecânica por 5 dias após a APB, com inibição de 41 ± 7 %, quando comparado com o grupo operado tratado com salina.

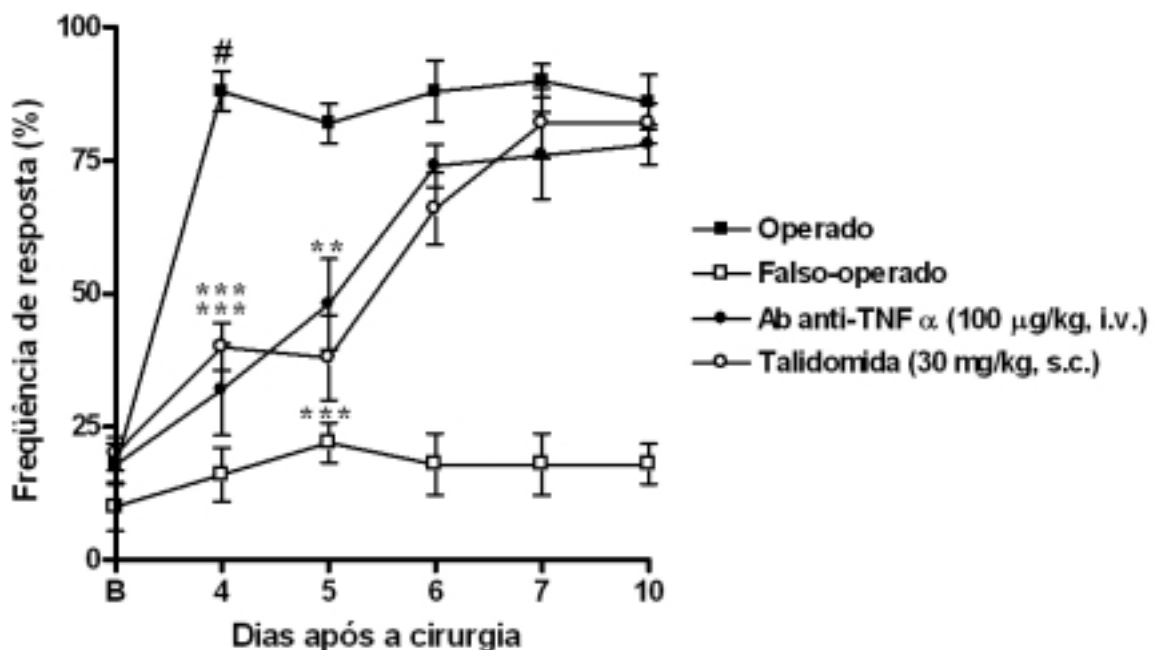


Figura 10 – Efeito do anticorpo anti-TNF α ou da talidomida na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpo anti-TNF α (100 μ g/kg, i.v.) ou com talidomida (30 mg/kg, s.c.), administrados no momento da cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, n=4-6. Difere significativamente do grupo falso operado ([#]) $p < 0,001$, e difere significativamente do grupo operado ^{**} $p < 0,01$ e ^{***} $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.4.1.3. Efeito do anticorpo anti-TNF α ou da talidomida na manutenção da resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela APB em camundongos

Para verificar o papel da citocina TNF α no processo de manutenção do quadro hipernociceptivo induzido pela APB, o anticorpo anti-TNF α (100 μ g/kg, i.v.) ou a talidomida (30 mg/kg, s.c.) foram administrados sistemicamente 4 dias após a cirurgia. A Figura 11 mostra que um único tratamento com o anticorpo ou com a talidomida foi capaz de bloquear a hipernocicepção mecânica por até 4 horas após a administração das drogas, com inibições de 41 ± 5 % e 52 ± 3 %, respectivamente.

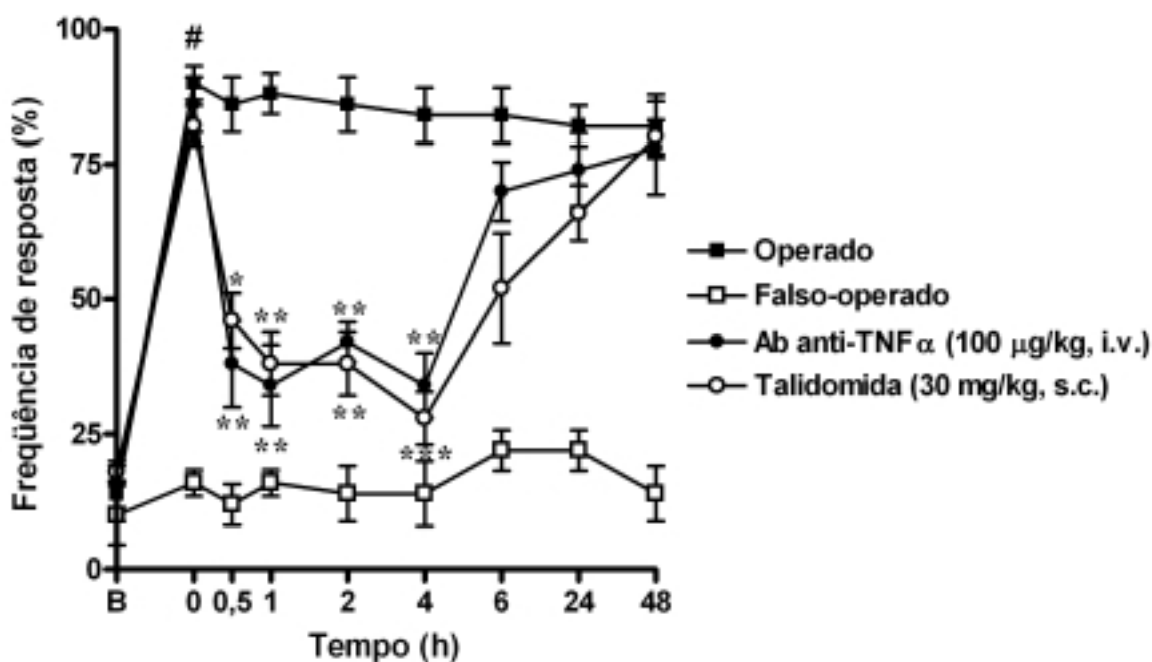


Figura 11 – Efeito do anticorpo anti-TNF α ou da talidomida na manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpo anti-TNF α (100 μ g/kg, i.v.) ou com talidomida (30 mg/kg, s.c.), administrados no 4º dia após a cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, n=4-6. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$, e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.4.2. Participação dos fatores neurotróficos

4.4.2.1. *Efeito da administração de anticorpos contra determinados fatores neurotróficos sobre a gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB*

A fim de avaliar o envolvimento dos fatores neurotróficos na gênese da resposta hipernociceptiva após a APB, os camundongos foram tratados localmente com os anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-BDNF ou anti-GDNF no momento da cirurgia. A Figura 12 demonstra que a aplicação local dos anticorpos anti-GDNF ou anti-BDNF foi capaz de prevenir, significativamente o desenvolvimento da hipernocicepção por até 20 e 14 dias após a cirurgia, com porcentagem de inibição de $83 \pm 1 \%$ e $77 \pm 2 \%$, respectivamente ($p < 0,001$). A administração local do anticorpo anti-NT-3 reduziu de maneira significativa a intensidade da hipernocicepção mecânica por 7 dias após a cirurgia, com inibição de $56 \pm 4 \%$ (Figura 12, $p < 0,01$). Além disso, o anticorpo anti-NGF inibiu efetivamente a hipernocicepção mecânica apenas entre o 6º e o 10º dia após a BPA, com porcentagem de inibição de $29 \pm 4 \%$ ($p < 0,05$, Figura 12).

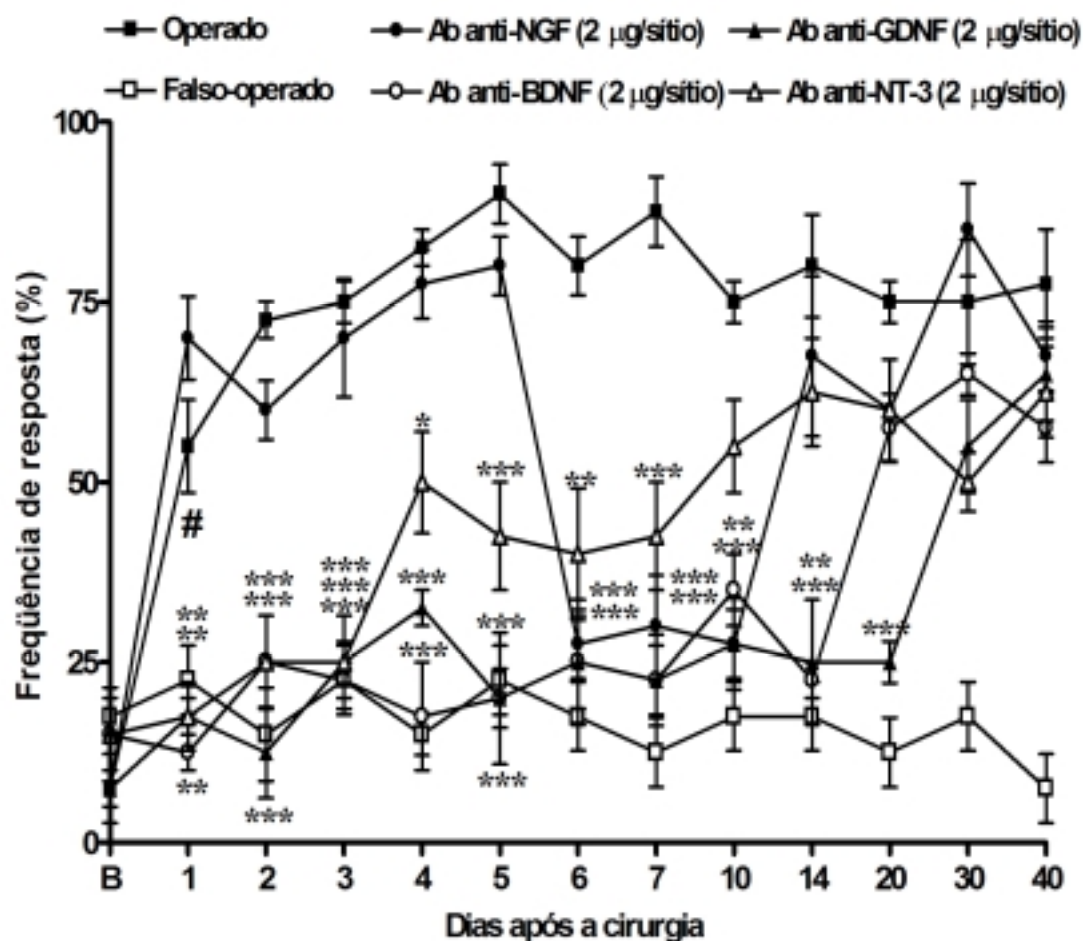


Figura 12 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados localmente, na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-BDNF ou anti-GDNF (2 µg/sítio), administrados localmente no momento da cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$, e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

Em outra série de experimentos, os anticorpos contra fatores neurotróficos foram administrados sistemicamente (100 µg/kg, i.p.) no momento da APB. Como demonstrado na Figura 13, a hipernocicepção mecânica foi significativamente reduzida até o 7º dia após a cirurgia, nos animais que receberam os anticorpos anti-NGF ou anti-NT-3 (100 µg/kg, i.p.), com inibições de $75 \pm 2 \%$ e $65 \pm 3 \%$, respectivamente ($p < 0,001$). O anticorpo anti-BDNF (100 µg/kg, i.p.), por sua vez, quando administrado por via i.p., produziu inibição significativa da hipernocicepção mecânica, apenas durante os primeiros 5 dias após a cirurgia (inibição de $42 \pm 2 \%$, $p < 0,001$, Figura 13). Entretanto, nos animais tratados com o anticorpo anti-GDNF (100 µg/kg, i.p.), a hipernocicepção mecânica foi suprimida por até 14 dias após a APB, com inibição de $72 \pm 2 \%$ ($p < 0,001$, Figura 13).

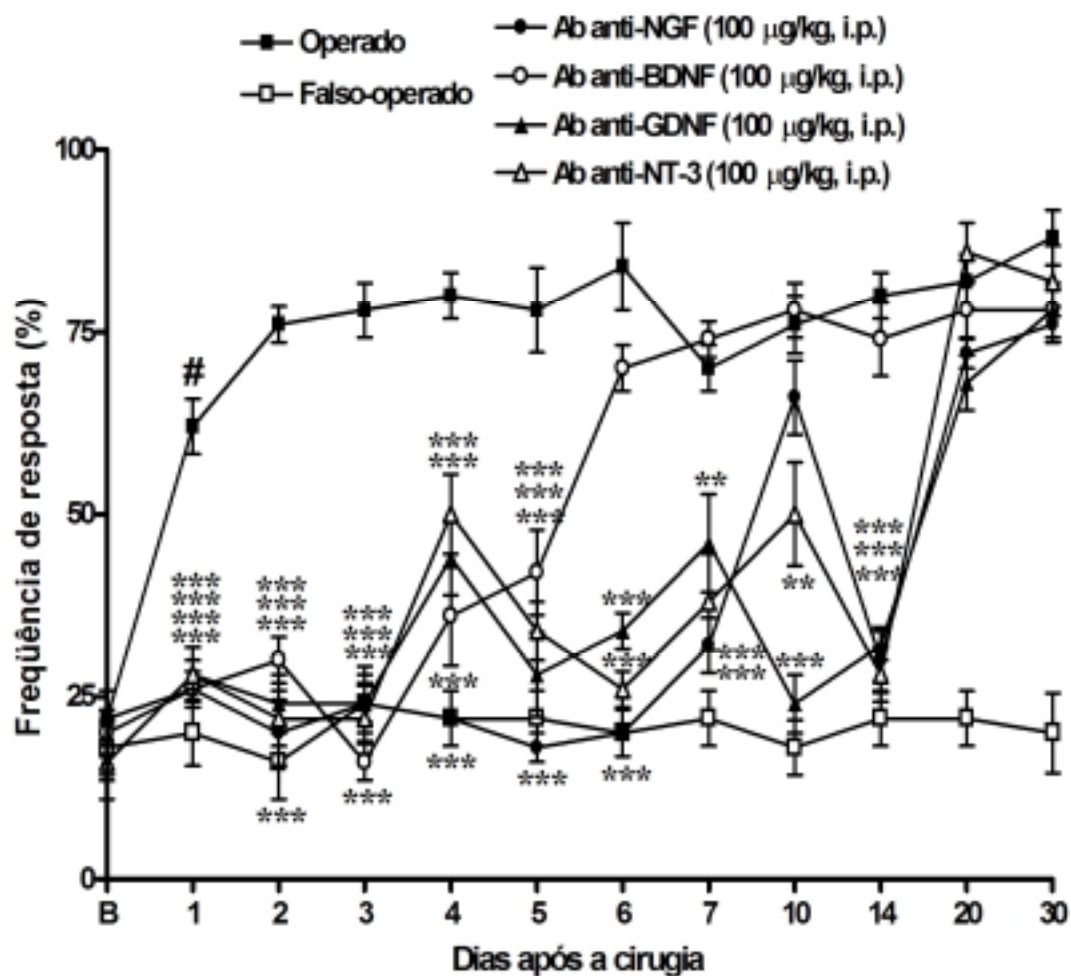


Figura 13 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados sistemicamente, na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-BDNF ou anti-GDNF (2 µg/sítio), administrados sistemicamente no momento da cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$, e difere significativamente do grupo operado ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

Para verificar o possível envolvimento das vias nociceptivas do SNC nas ações modulatórias dos fatores neurotróficos após a APB, os animais foram tratados por via i.t. (0,5 µg/sítio) ou por via i.c.v. (0,5 µg/sítio) com os anticorpos contra fatores neurotróficos no momento da cirurgia. A Figura 14 mostra que os anticorpos anti-NGF, anti-NT-3 ou anti-GDNF, administrados intratecalmente, foram capazes de prevenir parcialmente o aparecimento da resposta hipernociceptiva por até 7 dias após a APB, com porcentagens de inibição de $63 \pm 3 \%$, $56 \pm 6 \%$ e $55 \pm 2 \%$, respectivamente ($p < 0,01$, Figura 14). Os animais que receberam o anticorpo anti-BDNF tiveram a hipernocicepção mecânica significativamente reduzida apenas por 6 dias após a cirurgia (inibição de $50 \pm 6 \%$, $p < 0,01$, Figura 14).

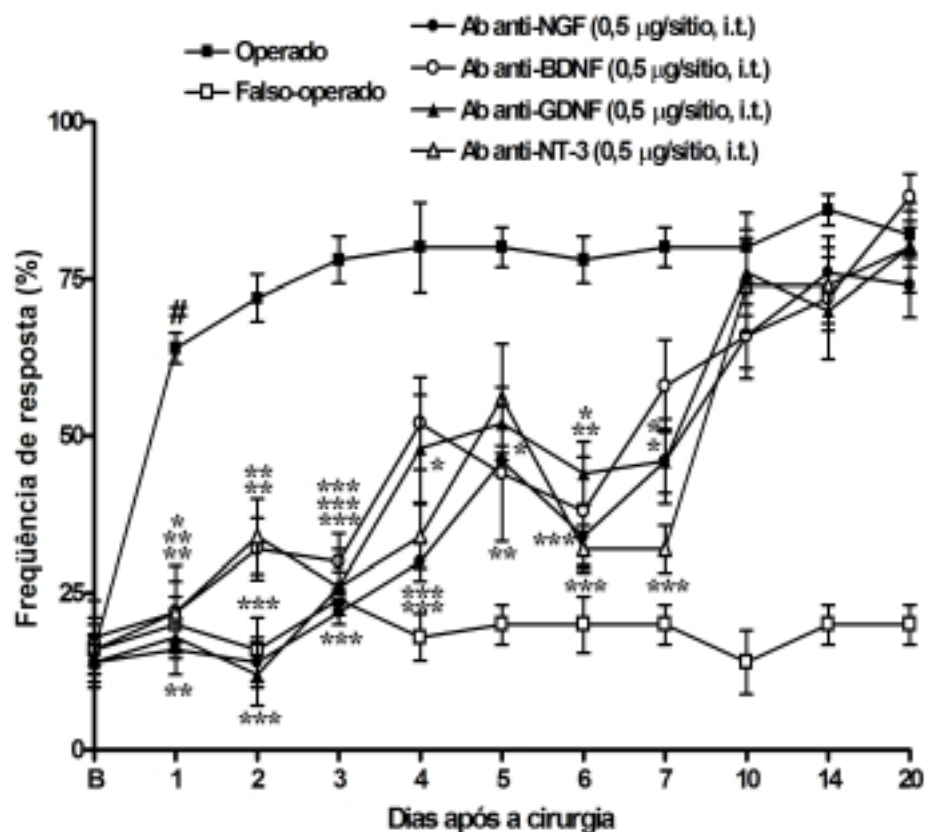


Figura 14 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados por via i.t., na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-BDNF ou anti-GDNF (2 µg/sítio), administrados por via i.t. no momento da cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$, e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

Quando os camundongos receberam uma injeção i.c.v. dos anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-GDNF ou anti-BDNF no momento da cirurgia, nenhum deles foi capaz de interferir com a instalação da hipernocicepção mecânica induzida pela APB (Figura 15).

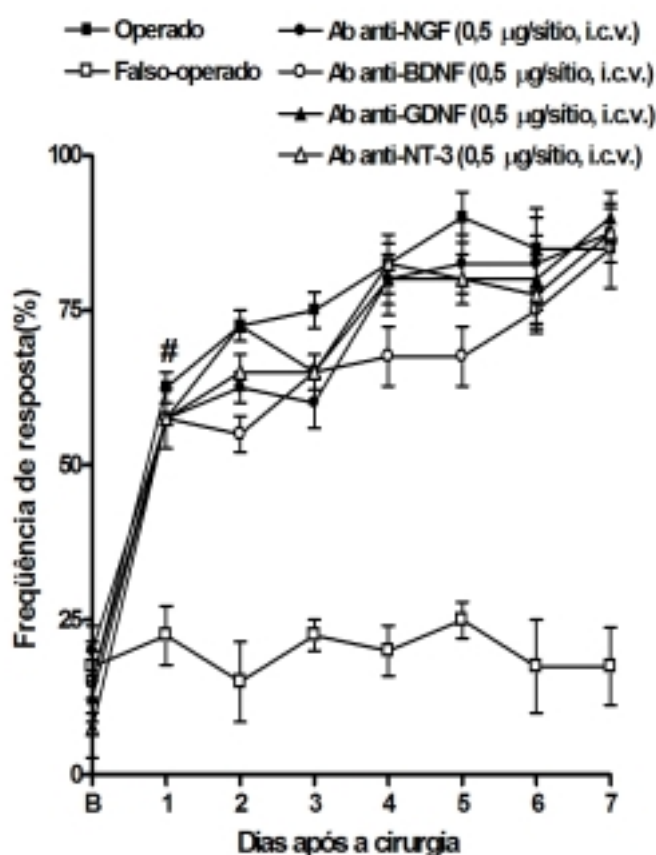


Figura 15 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados por via i.c.v., na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-BDNF ou anti-GDNF (2 µg/sítio), administrados por via i.c.v. no momento da cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.4.2.2. Efeito da administração de anticorpos anti-fatores-neurotróficos sobre a manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB

Para investigar o envolvimento dos fatores neurotróficos na manutenção da hipernocicepção mecânica após a APB, os anticorpos contra NGF, NT-3, GDNF ou BDNF foram administrados no 4º dia após a cirurgia. A Figura 16 demonstra que o tratamento sistêmico (100 µg/kg, i.p.) com os anticorpos anti-NTFs não alterou de forma significativa o aumento do limiar de resposta a estímulo mecânico induzido pela APB.

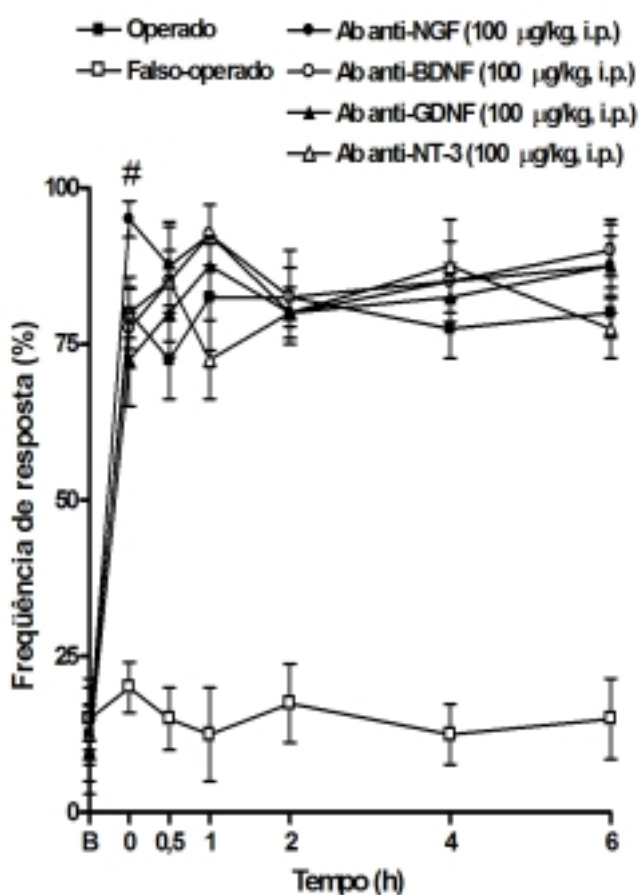


Figura 16 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados sistemicamente, na manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-BDNF ou anti-GDNF (2 µg/sítio), administrados por via sistêmica no 4º dia após a cirurgia. Os resultados apresentam a média ± erro padrão da média, n=4-6. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

Do mesmo modo, a administração por via i.t. dos anticorpos anti-NGF ou anti-GDNF (0,5 µg/sítio), 4 dias após a cirurgia, não produziu qualquer alteração significativa da resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela APB (Figura 17). Contudo, o anticorpo anti-NT-3 (0,5 µg/sítio, i.t.) reduziu a hipernocicepção mecânica induzida pela APB apenas durante a 1ª h após o tratamento (inibição de $14 \pm 3 \%$, $p < 0,05$, Figura 17). Além disso, como se pode observar na Figura 17, o anticorpo anti-BDNF (0,5 µg/sítio), quando administrado por via i.t. no 4º dia após a cirurgia, reverteu substancialmente a hipernocicepção mecânica por um período de 48 h após a injeção, com porcentagem de inibição de $52 \pm 6 \%$ ($p < 0,001$, Figura 17).

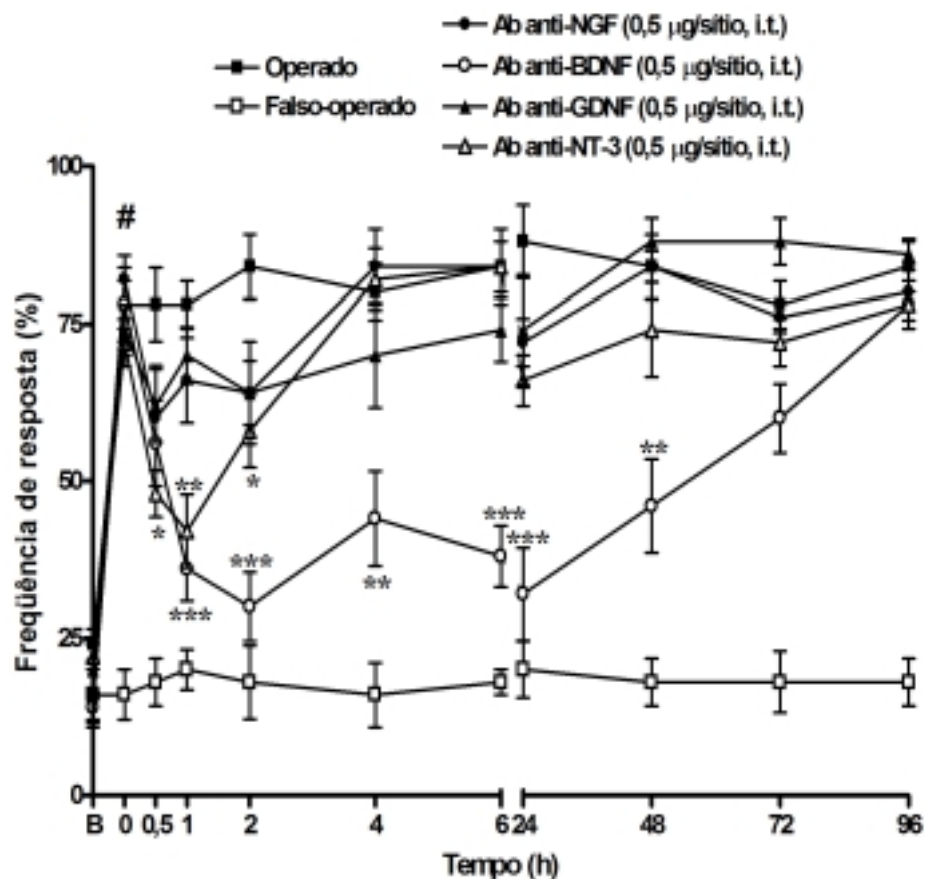


Figura 17 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados por via i.t., na manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-BDNF ou anti-GDNF (2 µg/sítio), administrados por via i.t. no 4º dia após a cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$ e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

Em outro grupo experimental, os anticorpos contra NGF, NT-3, GDNF ou BDNF (0,5 µg/sítio) foram administrados por via i.c.v. no 4º dia após a cirurgia. Os anticorpos anti-GF, anti-NT3 ou anti-GDNF não causaram efeito significativo sobre a hipernociceção mecânica induzida pela APB (Figura 18). De maneira interessante, a administração do anticorpo anti-BDNF por via i.c.v. produziu redução significativa da hipernociceção mecânica por até 10 dias após a cirurgia, com uma inibição de 59 ± 1 % ($p < 0,001$, Figura 18).

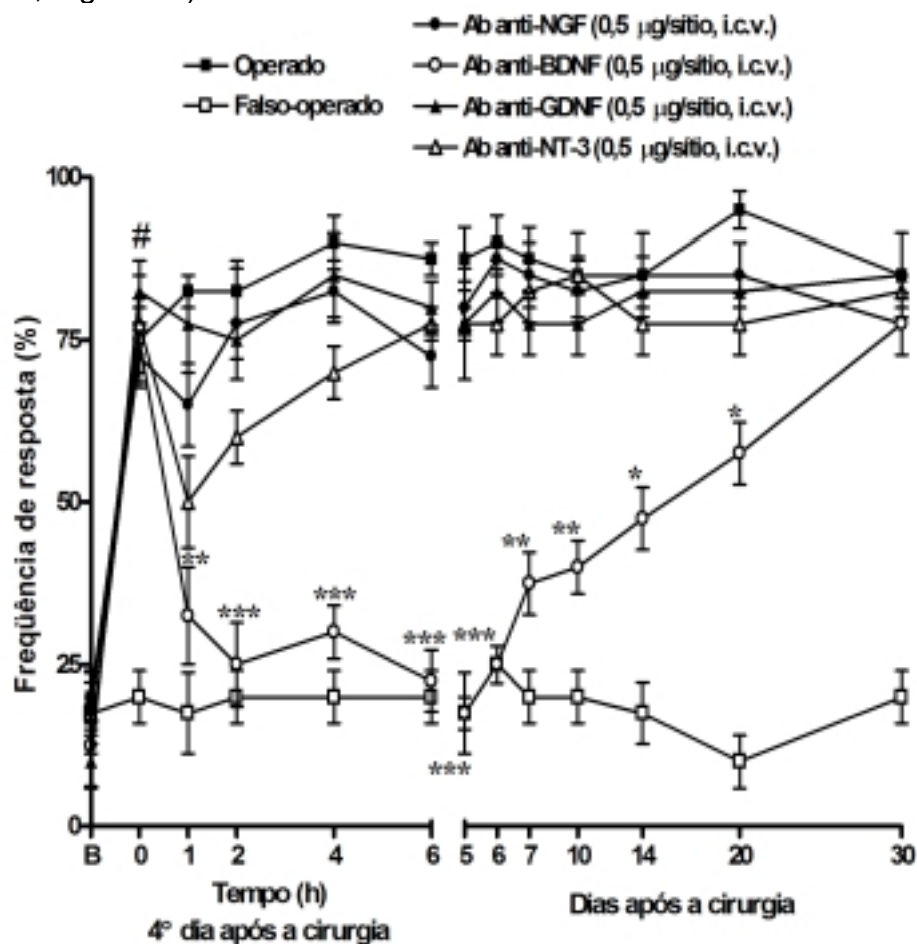


Figura 18 – Efeito dos anticorpos contra fatores neurotróficos, administrados por via i.c.v., na manutenção da hipernociceção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernociceção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com anticorpos anti-NGF, anti-NT-3, anti-BDNF ou anti-GDNF (2 µg/sítio), administrados por via i.c.v. no 4º dia após a cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$ e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

É válido ressaltar que o tratamento com a IgG controle não-imune, administrada através de diferentes vias (local, i.p., i.t. ou i.c.v.) não foi capaz de causar efeito significativo sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB, descartando qualquer efeito inespecífico dos anticorpos utilizados neste estudo (Figura 19).

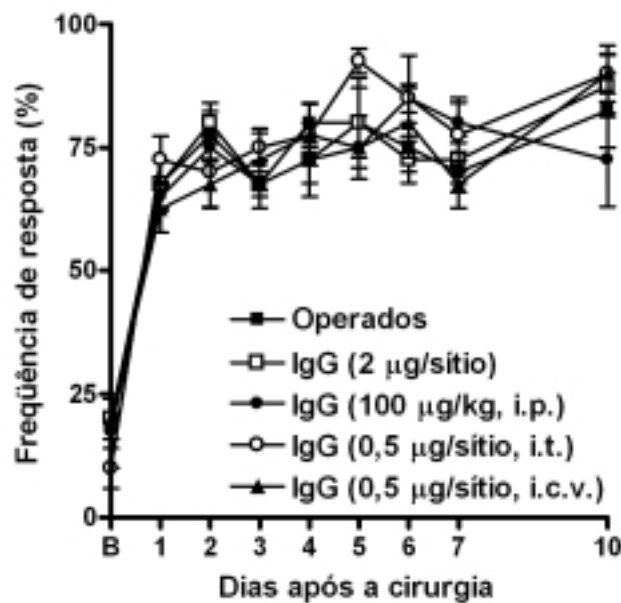


Figura 19 – Efeito da IgG sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com a IgG não-imune administrada por via local, i.p., i.t. ou i.c.v. no dia da cirurgia. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.4.3. Participação dos receptores B_2 e B_1 para cininas

4.4.3.1. Limiar mecânico e térmico de animais $B_2R^{-/-}$ submetidos à APB

À semelhança dos resultados demonstrados da Figura 8 A e B, a APB induziu redução significativa de ambos os limiares mecânico (Figura 20 A) e térmico (Figura 20 B) de retirada da pata traseira de camundongos selvagens da linhagem C57/BL6, quando comparados com o grupo de animais falso-operados. Quando camundongos $B_2R^{-/-}$ foram submetidos à APB, observou-se o desenvolvimento de hipernocicepção mecânica ($p < 0,001$), semelhante ao grupo selvagem-operado, durante todo o período de avaliação (por até 20 dias após a cirurgia), com inibição de apenas $26 \pm 7\%$ (Figura 20 A). Estes mesmos animais, quando submetidos ao teste de retirada da cauda frente a uma fonte de calor, apresentaram aumento no limiar térmico de intensidade similar animais selvagens-operados (Figura 20 B).

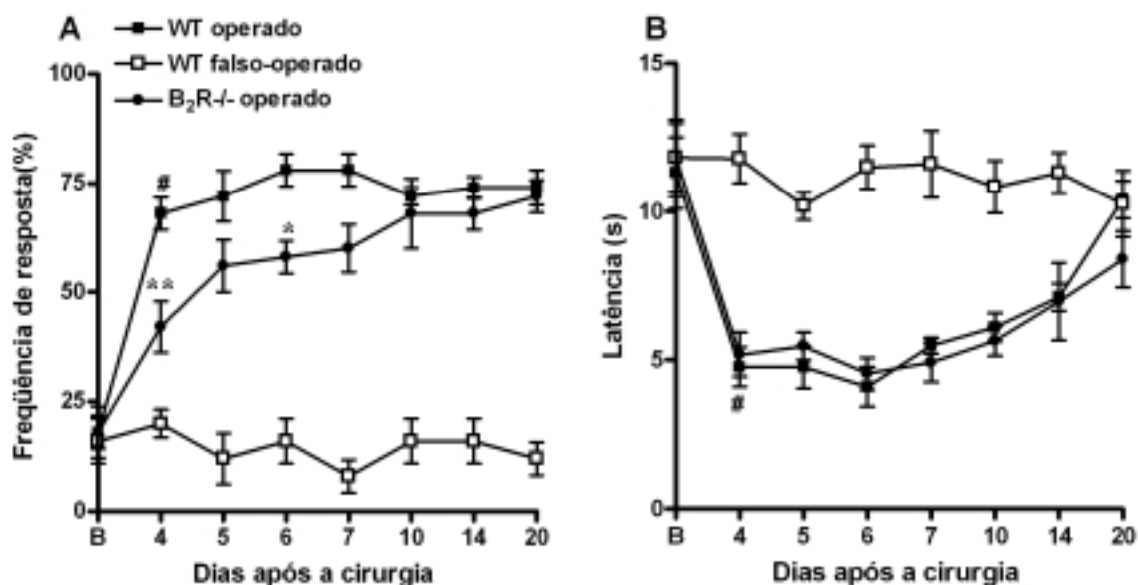


Figura 20 – Hipernocicepção mecânica e térmica induzidas pela avulsão do plexo braquial em camundongos com deleção gênica para o receptor B_2 para cininas. Hipernocicepção mecânica (A - verificada através da aplicação do VFH 0,6 g) e térmica (B - latência de retirada da cauda através da aplicação de uma fonte radiante de calor) em animais C57/BL6 ou $B_2R^{-/-}$ após a APB. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso operado (#) $p < 0,001$, e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.4.3.1. Efeito do antagonista seletivo para o receptor B_2 para cininas sobre a resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela APB em camundongos

O uso do antagonista seletivo para o receptor B_2 , o HOE-140, foi outra ferramenta utilizada para avaliar o envolvimento do receptor B_2 para cininas na hipernocicepção mecânica induzida pela APB. Como se observa na Figura 21 A, a administração local de HOE-140, no momento da cirurgia, foi capaz de causar uma leve redução da hipernocicepção mecânica induzida pela APB no 4º dia após a cirurgia (inibição de $18 \pm 9 \%$). Mesmo quando este antagonista foi administrado sistemicamente, no 4º dia após a APB, não foi observado qualquer alteração significativa da resposta hipernociceptiva induzida pela APB (Figura 21 B).

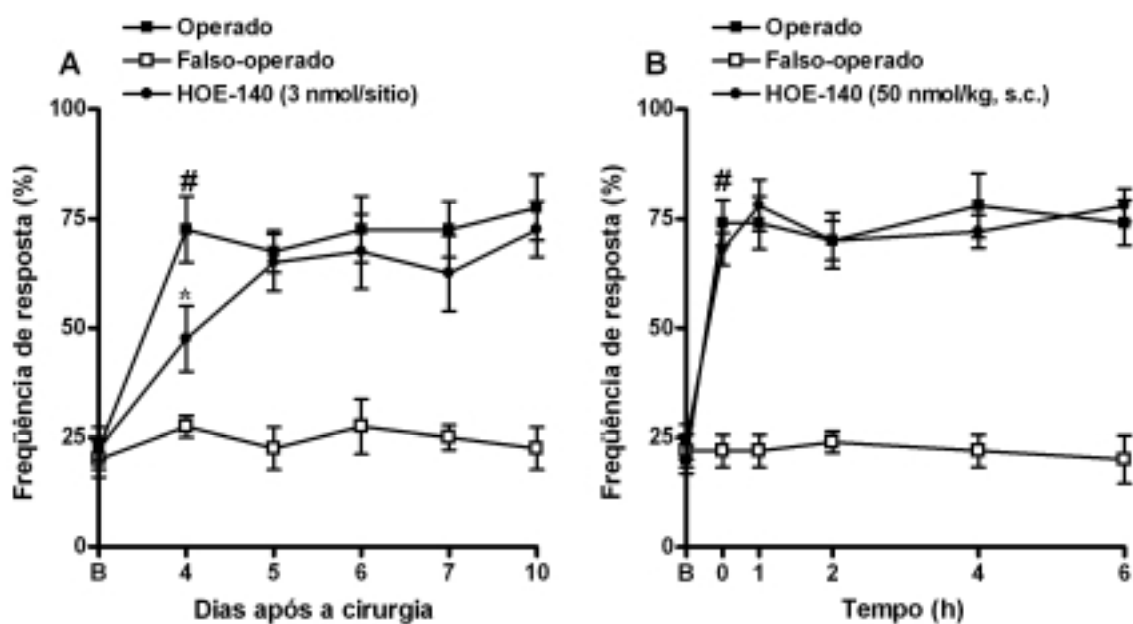


Figura 21 – Efeito do antagonista seletivo para o receptor B_2 , HOE-140, sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Hipernocicepção mecânica, verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g, de animais tratados com HOE-140, (A) administrado localmente (3 nmol/sítio) no momento da cirurgia, ou (B) administrado sistemicamente (50 nmol/kg, s.c.) no 4º dia após a APB. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado ($\#$) $p < 0,001$ e difere significativamente do grupo operado $*$ $p < 0,05$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.4.3.3. *Limiar mecânico e térmico de animais $B_1R^{-/-}$ submetidos à APB*

Os dados da Figura 22 demonstram que os animais selvagens da linhagem J129, quando submetidos à APB, foram capazes de desenvolver a hipernocicepção mecânica (Figura 22 A), de maneira similar aos camundongos Swiss ($p < 0,01$). Por outro lado, quando animais $B_1R^{-/-}$ foram submetidos à APB, não se observou alteração no limiar mecânico das patas traseiras direitas submetidas à estimulação com o VFH durante todo o período de avaliação (80 dias), em comparação com animais selvagens-operados (Figura 22 A, $p < 0,001$). Nesses mesmos animais, quando submetidos ao teste de retirada da cauda, não foram observadas alterações significativas quanto à sensibilidade térmica, quando comparados com animais selvagens-operados (Figura 22 B, $p < 0,001$).

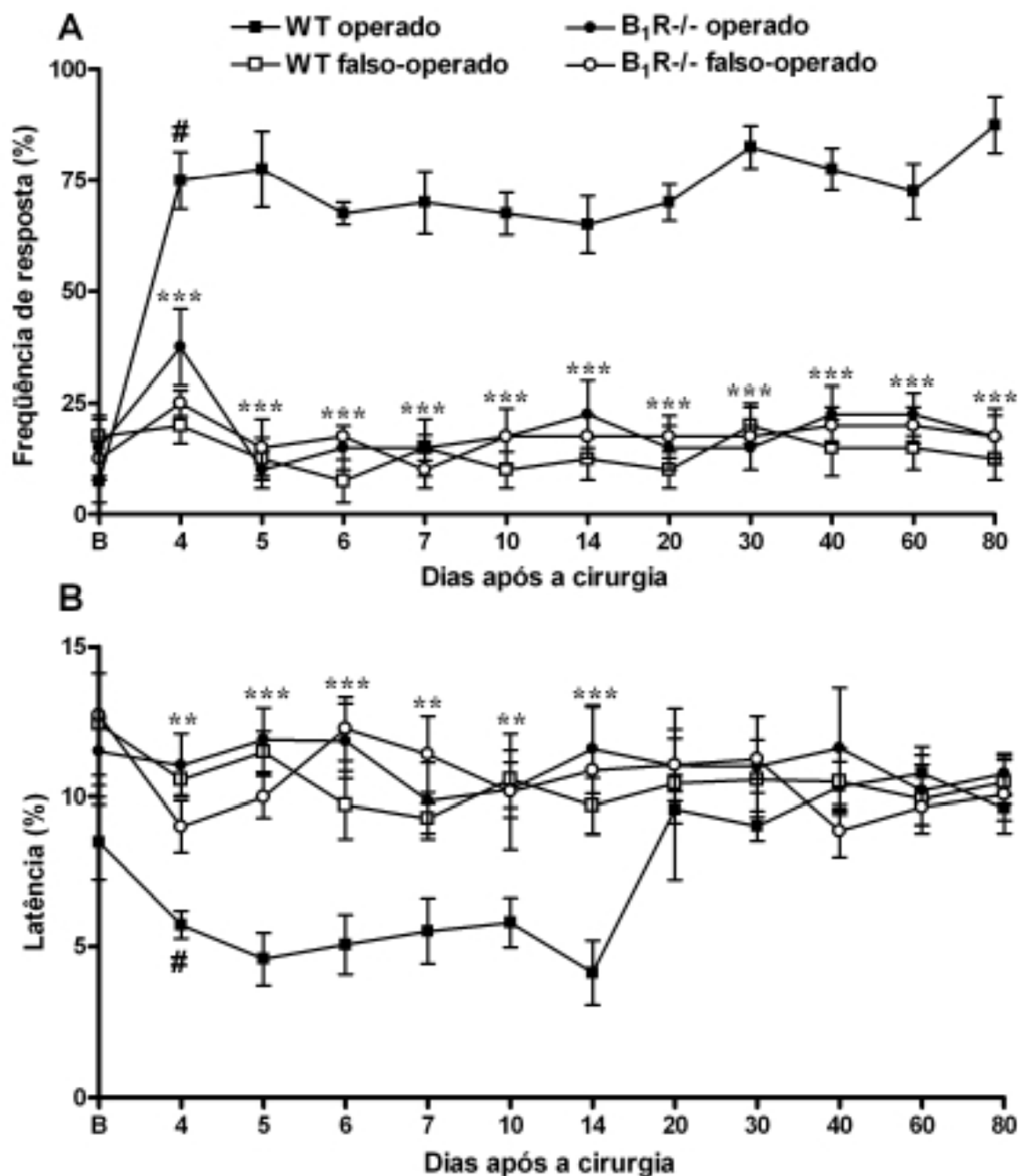


Figura 22 – Hipernociceção mecânica e térmica induzidas pela avulsão do plexo braquial em camundongos com deleção gênica para o receptor B₁ para cininas. Hipernociceção mecânica (A - verificada através da aplicação do VFH 0,6 g) e térmica (B - latência de retirada da cauda através da aplicação de uma fonte radiante de calor) em animais J129 ou B₁R^{-/-} após a APB. Os resultados apresentam a média ± erro padrão da média, n=4-6. Difere significativamente do grupo falso operado (#) p < 0,001, e difere significativamente do grupo operado ** p < 0,01 e *** p < 0,001. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.4.3.4. *Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B₁ para cininas sobre a resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela APB em camundongos*

Como se pode observar na Figura 23 A, ambos os antagonistas seletivos para o receptor B₁ para cininas, o R-715 (60 nmol/sítio) e o SSR-240612 (60 nmol/sítio) administrados localmente imediatamente após a cirurgia, preveniram o surgimento da hipernocicepção mecânica por até 10 dias após a APB, com inibições de $57 \pm 5 \%$ e $59 \pm 2 \%$, respectivamente ($p < 0,001$). Quando o R-715 (438 nmol/kg, i.p.) ou o SSR-240612 (390 nmol/kg, i.p.) foram administrados sistemicamente no momento da cirurgia, ambos os antagonistas foram capazes de retardar a instalação da hipernocicepção mecânica por até 7 dias após a APB, com inibições de $53 \pm 2 \%$ e $67 \pm 5 \%$, respectivamente (Figura 23 B). Por outro lado, tanto a administração i.t. quanto i.c.v. do R-715 ou SSR-240612 (25 nmol/sítio), no momento da cirurgia, não foi capaz de alterar de modo significativo a redução do limiar mecânico induzida pela APB (Figura 23 C e D).

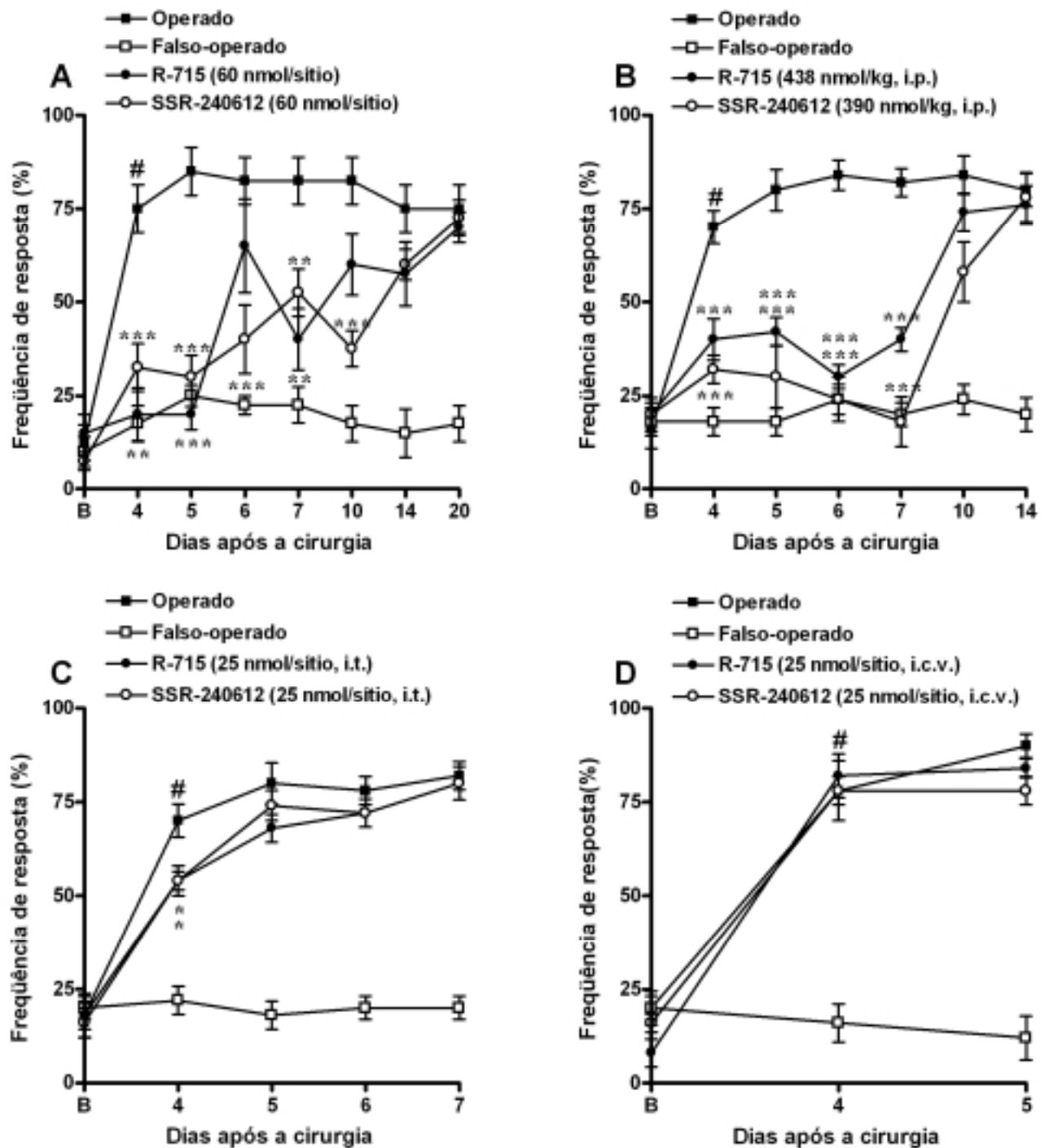


Figura 23 – Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B_1 , administrados no momento da cirurgia, sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Efeito da administração por via (A) local, (B) i.p., (C) i.t. ou (D) i.c.v. de R-715 ou SSR-240612, administrados no momento da cirurgia, sobre a hipernocicepção mecânica (verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g) induzida pela APB em camundongos. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$ e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

Com o objetivo de avaliar o envolvimento do receptor B₁ para cininas na manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB, os camundongos Swiss operados foram tratados com os antagonistas, por diferentes vias de administração, no 4º dia após o procedimento cirúrgico. Os resultados apresentados na Figura 24 A demonstram que o tratamento sistêmico com o R-715 (438 nmol/kg, i.p.) ou o SSR-240612 (390 nmol/kg, i.p.) foi efetivo em reduzir a hipernocicepção mecânica por 2 h após a administração das drogas, com inibições de $32 \pm 2 \%$ e $51 \pm 4 \%$, respectivamente. A administração por via i.t. do R-715 ou do SSR-240612 (25 nmol/sítio) inibiu significativamente a hipernocicepção mecânica por até 6 h após os tratamentos (inibição de $62 \pm 4 \%$ e $67 \pm 6 \%$, respectivamente). Todavia, quando os camundongos foram novamente tratados por via i.t. 10 dias após a APB os efeitos inibitórios foram significativos por apenas 2 h (inibição de $36 \pm 4 \%$ e $50 \pm 4 \%$, respectivamente) (Figura 24 B). De modo interessante, o tratamento por via i.c.v. com o R-715 ou o SSR-240612 (25 nmol/sítio, Figura 24 C), no 4º dia após a APB, foi capaz de reduzir significativamente a hipernocicepção mecânica apenas por meia hora após os tratamentos (inibição de $23 \pm 5 \%$ e $21 \pm 4 \%$, respectivamente). Porém, quando os animais receberam uma segunda injeção i.c.v. dos antagonistas, no 10º dia após a cirurgia, os efeitos inibitórios foram observados por até 4 h após a administração das drogas, com inibições de $47 \pm 2 \%$ e $61 \pm 3 \%$, respectivamente (Figura 24 C).

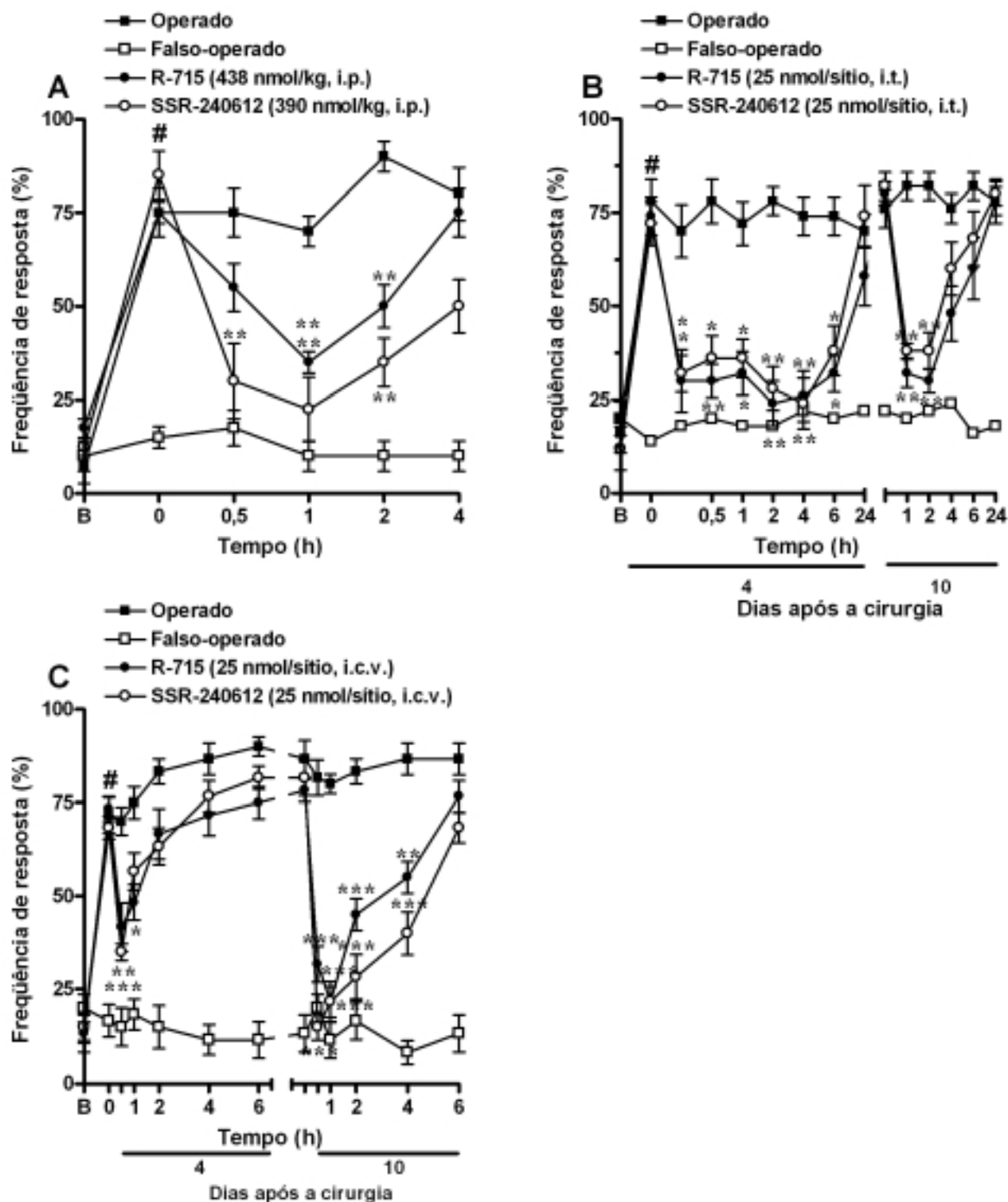


Figura 24 – Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B_1 , administrados no 4º dia após a cirurgia, sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Efeito da administração por via (A) i.p., (B) i.t. ou (C) i.c.v. de R-715 ou SSR-240612, administrados no 4º dia após a cirurgia, sobre a hipernocicepção mecânica (verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g) induzida pela APB em camundongos. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$ e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

Pos fim, a Figura 25 A demonstra que ambos os antagonistas, o R-715 (438 nmol/kg, i.p.) e o SSR 240612 (390 nmol/kg, i.p.), falharam em alterar de maneira significativa as alterações hipernociceptivas mecânicas induzidas pela APB, quando administrados sistemicamente, 30 dias após a cirurgia. Como mostrado na Figura 25 B, o tratamento por via i.t. com o R-715 (25 nmol/sítio) inibiu significativamente a hipernocicepção mecânica por apenas meia hora após os tratamentos ($12 \pm 2 \%$). Entretanto, quando os antagonistas foram administrados por via i.c.v. (Figura 25 C), a hipernocicepção mecânica foi marcadamente inibida, por até 6 h após a administração das drogas ($59 \pm 2 \%$ e $66 \pm 5 \%$, respectivamente).

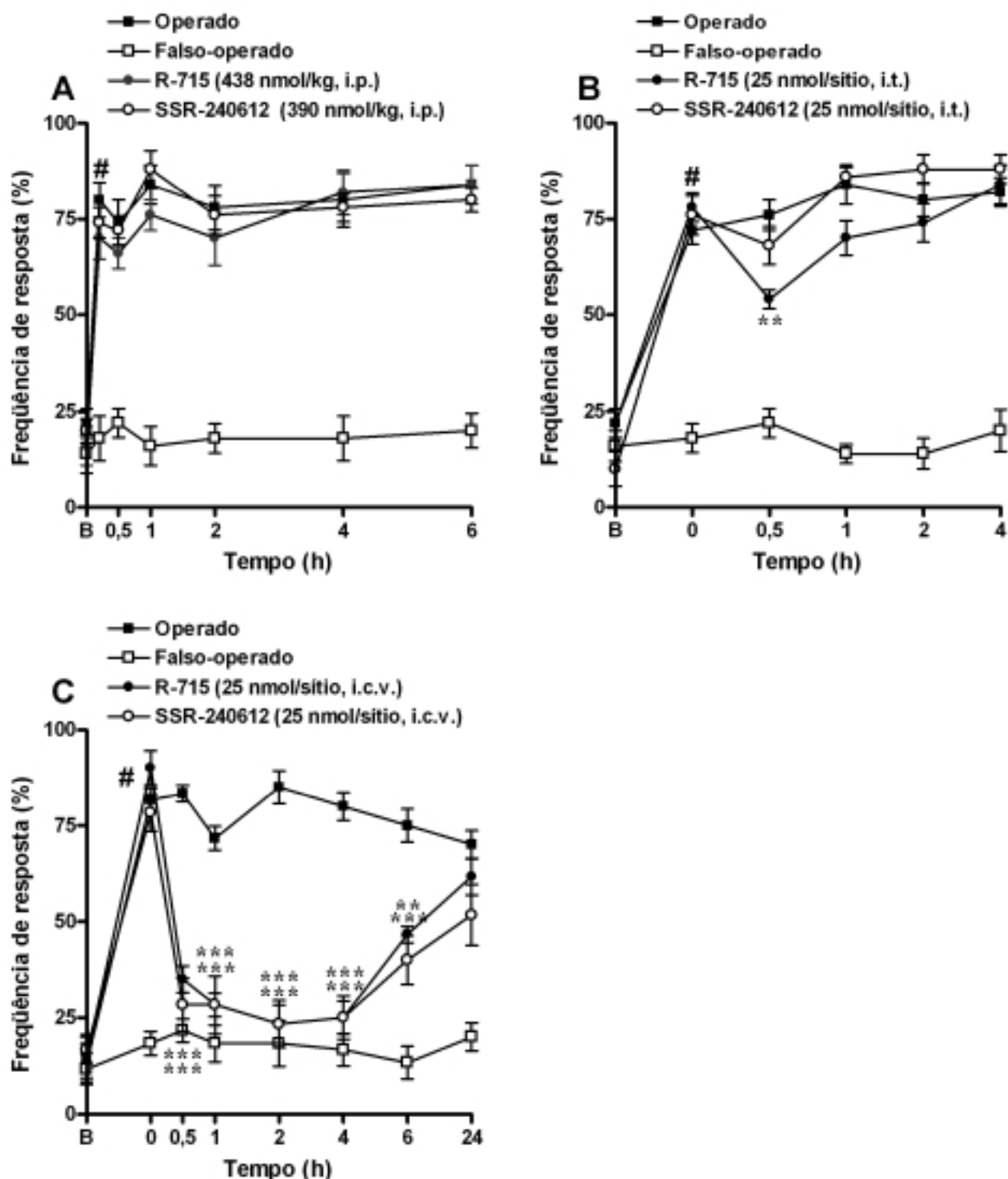


Figura 25 – Efeito de antagonistas seletivos para o receptor B_1 , administrados no 30º dia após a cirurgia, sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Efeito da administração por via (A) i.p., (B) i.t. ou (C) i.c.v. de R-715 ou SSR-240612, administrados no 30º dia após a cirurgia, sobre a hipernocicepção mecânica (verificada na pata traseira direita através da aplicação do VFH 0,6 g) induzida pela APB em camundongos. Os resultados apresentam a média \pm erro padrão da média, $n=4-6$. Difere significativamente do grupo falso-operado (#) $p < 0,001$ e difere significativamente do grupo operado * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* Bonferroni. B - limiar basal.

4.4.4. Análise de Biologia Molecular

4.4.4.1. *Efeito da APB sobre o aumento do RNAm para o receptor B₁ em estruturas do SNC de camundongos*

Com o objetivo de avaliar o efeito da APB sobre a indução da expressão do receptor B₁ para cininas em estruturas do SNC de camundongos, foram quantificados os níveis de RNAm para este receptor em amostra da medula espinhal, hipotálamo, hipocampo, tálamo e córtex, obtidos 4 e 30 dias após a cirurgia. A Figura 26 A demonstra que, 4 dias após a cirurgia, foi detectada a expressão do RNAm para o receptor B₁ em todas as estruturas estudadas obtidas de animais falso-operados. Entretanto, pode-se observar o aumento expressivo do RNAm para o receptor B₁ no hipotálamo, hipocampo, tálamo e córtex de animais submetidos a APB (Figura 26 A). De modo semelhante aos resultados obtidos 4 dias após a cirurgia, pode-se observar na Figura 26 B um aumento nos níveis de RNAm para o receptor B₁ no hipotálamo e córtex obtidos de animais sacrificados 30 dias após a cirurgia.

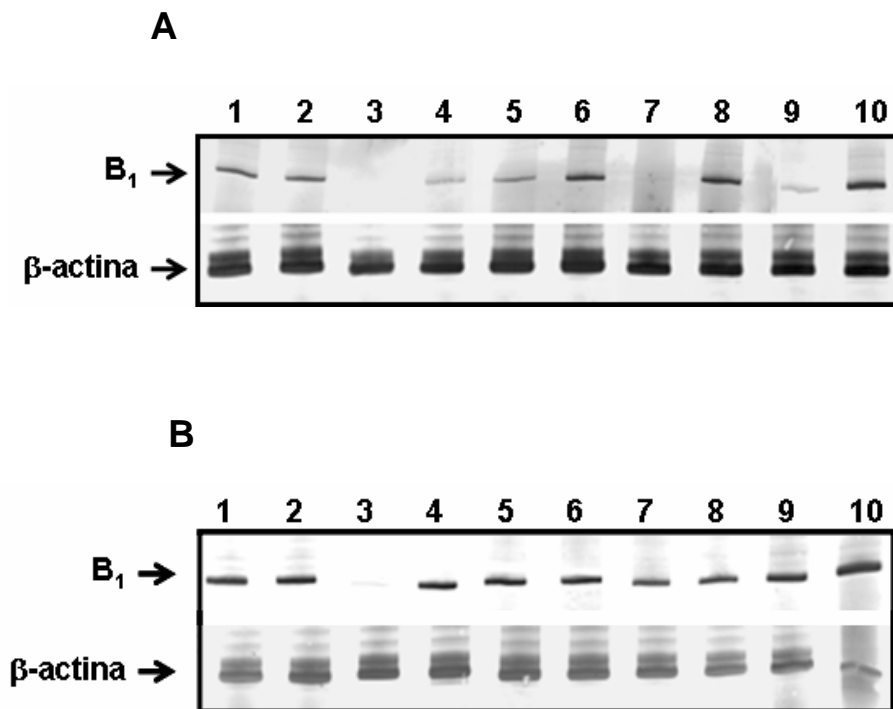


Figura 26 – Quantificação do RNAm para o receptor B₁ em estruturas do SNC de camundongos após a APB. Níveis de RNAm para o receptor B₁ na medula espinhal, hipotálamo, hipocampo, tálamo e córtex extraídos de animais falso-operados e operados, 4 (A) e 30 (B) dias após a cirurgia ou APB, avaliados através do ensaio de RT-PCR. Todos os dados foram normalizados pelos respectivos níveis da expressão do RNAm para a β-actina. Resultados obtidos através de 3 experimentos individuais. Medula falso operado (1) e operado (2); hipotálamo falso-operado (3) e operado (4); hipocampo falso-operado (5) e operado (6); tálamo falso-operado (7) e operado (8); córtex falso-operado (9) e operado (10).

4.4.4.2. Efeito da APB sobre o aumento da expressão dos receptores B_1 e B_2 para cininas na medula espinhal de camundongos

Na tentativa de confirmar o efeito da APB sobre o aumento na expressão dos receptores B_1 e B_2 para cininas na medula espinhal de camundongos, foi realizado o ensaio de Western blot. A Figura 27 A indica que há expressão basal do receptor B_1 para cininas na medula espinhal de camundongos falso-operados, 4 dias após a cirurgia. No entanto, nota-se um aumento desta expressão nos animais submetidos à APB. Por outro lado, a expressão do receptor B_2 parece não estar alterada nos animais operados, quando comparados ao grupo falso-operado (Figura 27 B).



Figura 27 – Expressão do receptor B_1 e B_2 na medula espinhal de camundongos 4 dias após a APB. Expressão do receptor (A) B_1 e do receptor (B) B_2 para cininas na medula espinhal extraída de animais falso-operados (1) e operados (2), 4 dias após a cirurgia ou APB, avaliados através do ensaio de Western blot. Resultados obtidos através de 3 experimentos individuais.

5. DISCUSSÃO

Por séculos, médicos foram doutrinados a examinar seus pacientes e classificá-los com base na lesão topográfica e na doença subentendida. Mas o que fazer se o sintoma se torna uma doença? Como mencionado na introdução desta tese, apesar dos avanços recentes acerca da elucidação dos mecanismos envolvidos na gênese e na manutenção da dor neuropática, seu tratamento continua sendo um grande desafio. Evidências experimentais demonstram que a dor de origem neuropática envolve, não somente, alterações da percepção de diferentes estímulos nociceptivos (estímulo quente, frio, químico e tátil), mas também interfere nas respostas emocionais e cognitivas do indivíduo. Sabe-se ainda, que a dor de caráter persistente envolve mecanismos complexos no sítio da lesão (neurônio sensorial primário), bem como em neurônios do sistema nervoso central (medula espinhal e cérebro). Isto explica, em parte, porque as drogas disponíveis no mercado, atualmente utilizadas para o tratamento da dor neuropática, não representam cura para o indivíduo, apresentando apenas eficácia moderada ou mesmo paliativa, com o objetivo de restaurar o sono, manter as funções e a melhora da qualidade de vida (GALLUZZI, 2005). Além disso, muitas destas drogas, após o uso prolongado, produzem vários efeitos indesejáveis.

Em virtude das diferentes etiologias e, principalmente, devido a sua complexidade, os modelos experimentais atualmente disponíveis ainda não reproduzem completamente as manifestações clínicas da dor neuropática. É provável que existam importantes variações entre as suas diversas origens e as respostas observadas na clínica entre os pacientes. Os mecanismos precisos implicados neste grupo de doenças e a relação entre estes mecanismos e os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes ainda não são bem compreendidos. Provavelmente, um

mecanismo produz determinados sintomas, ou um sintoma pode ser decorrente da ativação de vários mecanismos (HARDEN e COHEN, 2003).

Fica, portanto, evidente que o estabelecimento de novos modelos experimentais que mimetizem, pelo menos em parte, os sintomas persistentes observados em pacientes com dor neuropática, ainda é necessário. Neste estudo, foram avaliadas, pela primeira vez, as alterações nociceptivas persistentes decorrentes da APB em camundongos. Cabe ressaltar que todos os experimentos subseqüentes, realizados para avaliar os mecanismos envolvidos na gênese e na manutenção das respostas hipernociceptivas induzidas pela APB, foram realizados utilizando a pata traseira direita do animal. Isto porque, após a APB, tanto as fibras sensoriais quanto as fibras motoras são completamente rompidas resultando na perda da atividade funcional da pata dianteira operada (força de flexão dos artelhos). Com isto, os animais não são capazes de reagir à estimulação térmica ou mecânica.

Em camundongos Swiss, foi demonstrado claramente que a APB produz hipernocicepção mecânica persistente e pronunciada por até 80 dias após a cirurgia, e de maneira menos evidente, hipernocicepção térmica (até 10 dias após a cirurgia) quando avaliada na pata traseira direita (QUINTÃO et al., 2006). Como já descrito na literatura, as respostas hipernociceptivas mecânicas induzidas pela lesão de nervo periférico são decorrentes da atividade alterada de fibras A β (de baixo limiar), responsáveis por transmitirem estímulos mecânicos inócuos, que se reorganizam anatomicamente e passam a mediar a transmissão dolorosa (MACFARLANE et al., 1997; WOOLF e MANNION, 1999). Já as alterações na sensibilidade térmica envolvem, principalmente, fibras C não-mielinizadas (WOOLF e MANNION, 1999). Com isto pode-se explicar, em parte, a diferença na duração das respostas hipernociceptivas mecânica e térmica, levando-se em conta que vias distintas estão

envolvidas nestes dois tipos de hipernocicepção (LEE et al., 1994; TAL e BENNETT, 1994). Outro dado importante, observado no presente estudo, é que estas alterações hipernociceptivas observadas em camundongos Swiss são semelhantes às aquelas observadas em camundongos da linhagem C57/BL6 e J129, o que sugere que estas linhagens diferentes de camundongos respondem de forma semelhante, em relação aos parâmetros avaliados, após a APB.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com aqueles obtidos anteriormente em ratos (RODRIGUES-FILHO et al., 2003), os quais mostraram a ocorrência de hipernocicepção mecânica por até 90 dias após a APB. O mesmo pode ser afirmado em relação à ausência de autotomia do membro operado, um processo freqüentemente observado na maior parte dos modelos de dor neuropática envolvendo a avulsão de nervos periféricos (LOMBARD et al., 1979; SELTZER, 1995). Outro fato importante é que as respostas hipernociceptivas observadas após a APB persistem por um longo período de tempo, sendo observadas em sítios distantes do local da lesão. Segundo RODRIGUES-FILHO et al. (2003), este fenômeno parece estar relacionado com o processo de avulsão, uma vez que as respostas hipernociceptivas térmica e mecânica nos membros traseiros foram completamente ausentes após a constrição ou esmagamento do plexo braquial em ratos.

Foi observado ainda que o aumento na sensibilidade mecânica da pata traseira direita dos animais submetidos à APB ocorre já no primeiro dia após a cirurgia. Como esta lesão é decorrente da avulsão do plexo braquial, muitas das alterações plásticas ocorrem, provavelmente, em um nível mais alto da medula (medula cervical), quando comparado com os demais modelos existentes de lesão de nervo periférico, podendo acarretar alterações plásticas de todo o seguimento medular situado abaixo do nível da

lesão. Talvez esta seja uma das possíveis causas da rápida instalação das respostas hipernociceptivas em locais distantes da lesão (patas posteriores e cauda).

Vale ressaltar que a APB não causou comprometimento no ganho de peso dos animais, bem como na atividade locomotora dos mesmos. Estes resultados são de grande importância, pois excluem a possibilidade da interferência de sinais de prostração nas respostas obtidas com as drogas utilizadas. Entretanto, foi observada uma alteração na coordenação motora dos animais quando avaliados 30 dias após a APB. Possivelmente, esta alteração seja decorrente da perda dos movimentos de preensão da pata dianteira submetida à APB que, com o passar do tempo entra em desuso e perde a função.

Considerando a reprodução dos sintomas observados em humanos, é possível dizer que o modelo de APB em camundongos apresenta muitas vantagens com relação aos demais modelos descritos na literatura, tais como a constrição parcial ou completa do nervo ciático, a transecção do nervo espinhal ou a constrição de raízes lombares (MALMBERG e BASBAUM, 1998; BESSON, 1999; SOMMER al., 1999; 2001a; FAIRBANKS et al., 2000), possibilitando ainda a aplicação de ferramentas adicionais, como por exemplo, a utilização de animais com deleção gênica, para maior entendimento deste processo patológico.

Estudos recentes têm demonstrado que uma série de alterações biológicas sucede a lesão do sistema nervoso, a qual eventualmente resulta na sensibilização de elementos neuronais envolvidos no processamento de informações nociceptivas (para revisão ver: BESSON, 1999; WOOLF e SALTER, 2000; JENSEN et al., 2001). Entretanto, a relevância destas alterações moleculares após a lesão nervosa ainda não foi determinada. O entendimento dos eventos decorridos após a lesão nervosa poderia

representar a solução para a compreensão dos mecanismos de hiperexcitabilidade, inclusive em relação às formas de tratamento.

Como mencionado anteriormente, a lesão de nervos periféricos acarreta na infiltração de células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos que liberam no sítio da lesão, dentre outras citocinas, o $\text{TNF}\alpha$. A produção destas citocinas também pode ser decorrente da ruptura das células de Schwann ou da micróglia (WATKINS et al., 1995). Dados da literatura indicam que o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-1 β) é observado no segmento do nervo ciático após a lesão nervosa em ratos (CUI et al., 2000; OKANOTO et al., 2001). Outras evidências experimentais também demonstraram que as ações do $\text{TNF}\alpha$ são seguidas do recrutamento de proteínas adaptadoras associadas com a ativação de determinados fatores de transcrição, tais como o NF- κ B e o AP-1 (AGGARWAL et al., 2001a, b; FELDMANN et al., 2001; MACEWAN, 2002). O $\text{TNF}\alpha$ exerce a maior parte de seus efeitos através da ativação de dois receptores distintos denominados de “p55” (TNFR1) e “p75” (TNFR2) (VANDENABEELE et al., 1995). Recentemente, George e colaboradores (2005) demonstraram a ocorrência do aumento rápido e transitório dos níveis de $\text{TNF}\alpha$, seguido pelo aumento na expressão de ambos os receptores “p55” e “p75” após a lesão por constrição crônica do nervo ciático. Além disso, os mesmos autores demonstraram que a regulação dos dois receptores para $\text{TNF}\alpha$ ocorre de maneira distinta: enquanto o aumento na expressão do receptor “p55” após a lesão nervosa é discreto e lento, o aumento na expressão do receptor “p75” é rápido, marcante e persistente.

Os dados apresentados neste estudo demonstram pela primeira vez que animais com deleção gênica para o receptor “p55” não desenvolveram hipernocicepção mecânica ou térmica quando submetidos à APB, sugerindo que a citocina $\text{TNF}\alpha$

desempenha um papel fundamental no estabelecimento das alterações hipernociceptivas observadas neste modelo. Estes resultados foram estendidos por outros experimentos em que o anticorpo anti-TNF α foi administrado no momento da avulsão, sendo também capaz de prevenir o surgimento da hipernocicepção mecânica após a APB.

Dados da literatura demonstram que a neutralização do TNF α pela aplicação local de anticorpo anti-TNF α no momento da cirurgia é capaz de reduzir tanto a hipernocicepção mecânica quanto a hipernocicepção térmica induzidas pela constrição ou transecção parcial do nervo ciático (LINDENLAUB et al., 2000; SOMMER et al., 2001a). Quando o anticorpo foi administrado localmente 4 dias após a cirurgia, o mesmo foi capaz de causar inibição apenas da hipernocicepção mecânica induzida pela transecção parcial do nervo ciático (SOMMER et al., 2001a). No presente estudo, evidências adicionais envolvendo o TNF α na dor neuropática persistente após a APB foram obtidas com a utilização, além do anticorpo anti-TNF α , da talidomida - um inibidor preferencial da síntese de TNF α . A talidomida e seus análogos são capazes de reduzir a síntese de TNF α , efeito este observado em menor grau para as demais citocinas (SAMPAIO et al., 1991). Este medicamento foi introduzido no mercado em 1957, como droga hipnótica, sedativa e anti-emética, com a característica de ser extremamente segura em superdosagens. A primeira suspeita de teratogênese surgiu em 1961, com o aumento súbito na incidência de focomelia, o que culminou com a conseqüente retirada da talidomida do mercado. Porém, em 1998, o FDA (Food and Drug Administration) aprovou sua utilização para o tratamento de complicações inflamatórias da Doença de Hansen, e, desde então, surgiram novos estudos acerca dos efeitos antiinflamatórios, imunomoduladores e anti-angiogênicos da talidomida (CALABRESE e FLEISCHER, 2000).

Como se pode observar no presente estudo, o tratamento sistêmico com o anticorpo anti-TNF α ou com a talidomida causou redução significativa da hipernocicepção mecânica induzida pela APB, tanto quando administrados no momento, quanto 4 dias após a cirurgia. SOMMER e colaboradores (1998b) demonstraram que a talidomida foi efetiva em inibir os efeitos comportamentais (hipernocicepção mecânica) induzidos pela constrição do nervo ciático em ratos, apenas quando administrada no momento da cirurgia. Entretanto, quando os animais foram tratados no 6º dia pós-cirúrgico nenhum efeito foi observado. Em outro estudo, a talidomida foi capaz de reduzir a hipernocicepção mecânica e térmica no mesmo modelo citado acima, sendo que este efeito foi diretamente relacionado com a redução dos níveis endoneurais de TNF α (GEORGE et al., 2000). Estes dados permitem sugerir que o TNF α exerce um importante papel na instalação e na manutenção do comportamento hipernociceptivo induzido pela APB em camundongos.

Em estudos preliminares, Shubayev e Myers (2001, 2002) demonstraram que a constrição parcial do nervo ciático em ratos induz aumento nos níveis de TNF α tanto no sítio da lesão quanto no gânglio da raiz dorsal, entre o 2º e o 5º dia após a cirurgia. Tem sido descrita também, a ocorrência tanto de transporte retrógrado quanto anterógrado de TNF α após a lesão nervosa periférica (SCHÄFERS et al., 2002; SHUBAYEV e MYERS, 2002). Covey e colaboradores (2002) observaram um aumento nos níveis de TNF α na medula espinhal toraco-lombar e em neurônios localizados no *locus coeruleus* após a constrição do nervo ciático. Recentemente, Schäfers et al. (2003) sugeriram que após a lesão nervosa, a hipernocicepção somatotopicamente delimitada reflete o processamento alterado de impulsos nervosos no gânglio da raiz dorsal não lesionado e que, estas alterações envolvem a participação da citocina TNF α . Sabe-se também que a injeção intraneural de TNF α , em doses fisiológicas, é

capaz de causar hipernocicepção mecânica e térmica de caráter persistentes, com o envolvimento, principalmente, de fibras C (ZELENKA et al., 2005).

Os resultados aqui apresentados, em conjunto com os dados da literatura, demonstram, claramente, o importante papel desempenhado pela citocina pró-inflamatória $TNF\alpha$ em alguns modelos animais de dor neuropática. Pode-se sugerir que a inibição farmacológica da produção do $TNF\alpha$ ou o bloqueio de seus receptores poderia constituir uma estratégia terapêutica bastante interessante nos casos de alterações dolorosas crônicas, que ainda permanecem sem tratamento satisfatório. De fato, o Etanercept, uma forma recombinante do receptor $TNF\alpha$ 'p75'-Fc, tem sido utilizado com sucesso em pacientes com artrite reumatóide, com o objetivo de reduzir a dor e a inflamação (MORELAND et al., 1997). Foi ainda demonstrado que o tratamento sistêmico com Etanercept é capaz de reduzir a hipernocicepção mecânica e térmica após a constrição do nervo ciático ou ligação dos nervos espinhais em camundongos (SOMMER et al., 2001b). Além do mais, em humanos, o Etanercept também apresenta efeitos favoráveis na dor cervical decorrente de lesão no disco intervertebral, permitindo uma restauração significativa da função (TOBINICK, 2003).

Já está claro na literatura o fato de que, além do $TNF\alpha$, os fatores neurotróficos constituem importantes mediadores na hipernocicepção de origem inflamatória e neuropática (SAH et al., 2003) e, alguns trabalhos indicam que o aumento na expressão de NGF, BDNF e GDNF é secundário ao aumento nos níveis de $TNF\alpha$ (WOOLF et al., 1997; MENDELL et al., 1999; ONDA et al., 2004). Com base nestas e outras evidências procuramos avaliar a importância de determinados fatores neurotróficos nas respostas hipernociceptivas induzidas pela APB. Os fatores neurotróficos fazem parte de uma família de pequenas proteínas secretórias diméricas que afetam todos os aspectos biológicos dos neurônios (para revisão ver: POO, 2001).

Recentemente, estas proteínas têm sido alvos da investigação acerca dos mecanismos envolvidos na dor crônica (THOENEN e SENDTNER, 2002; SAH et al., 2003). Sendo assim, o presente estudo avaliou o papel desempenhado pelos fatores neurotróficos tanto na instalação, como na perpetuação da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos, através da administração de anticorpos contra NGF, NT-3, GDNF ou BDNF, em diferentes intervalos de tempo e por vias de administração distintas.

Os resultados apresentados sugerem fortemente que o NGF está envolvido tanto na gênese, quanto na manutenção das alterações hipernociceptivas induzidas pela APB. Primeiramente, o anticorpo anti-NGF foi capaz de retardar por um longo período de tempo o desenvolvimento da hipernocicepção mecânica induzida pela APB, quando administrado sistemicamente ou por via intratecal no momento da cirurgia, ao passo que o mesmo reduziu parcialmente a resposta hipernociceptiva quando instilado no local e no momento da lesão. Porém, quando administrado no 4º dia após a cirurgia, o anticorpo anti-NGF não causou nenhuma alteração, independente da via de administração. Como mencionado anteriormente, o NGF foi o primeiro fator neurotrófico a ser descoberto e purificado, representando o protótipo das neurotrofinas (LEVI-MONTALCINI, 1987). Seus efeitos são mediados por dois receptores, o receptor de tirosina quinase TrkA e o receptor não específico para neurotrofinas $p75^{NTR}$, conhecido por se ligar a outras neurotrofinas, tais como NT-3 e BDNF (CHAO, 2003). O NGF é comumente sintetizado e secretado pelos tecidos alvo, ligando-se a seus receptores nos terminais axonais. Em seguida, o complexo NGF-receptor sofre internalização e é transportado de maneira retrógrada aos corpos celulares dos neurônios sensoriais (POO, 2001), o que pode sugerir a interação com vias nociceptivas, tanto no SNP quanto no SNC. Até então, sabe-se que o NGF é capaz de

induzir hiperalgesia mecânica e térmica em ratos (MALIK-HALL et al., 2005) e que a sensibilização sensorial causada por agentes inflamatórios parece ser dependente de NGF (MA e WOOLF, 1997). Além disso, os níveis de NGF e a expressão de seus receptores estão aumentados em animais submetidos ao modelo de lesão do nervo periférico ou lesão medular (RAMER et al., 1997). Dados da literatura demonstram também que agentes que bloqueiam a ação do NGF são efetivos, pelo menos em parte, em prevenir a hipernocicepção mecânica e térmica (THEODOSIOU et al., 1999; GWAK et al., 2003; LI et al., 2003). No presente estudo, demonstramos primeiramente que o $TNF\alpha$ está implicado nas respostas hipernociceptivas após a APB (QUINTÃO et al., 2006). Levando-se em conta que o aumento dos níveis de NGF após lesão tecidual parece estar ligado diretamente à produção de $TNF\alpha$ (CORREALE e VILLA, 2004; ONDA et al., 2004), é possível inferir que a produção de NGF (provavelmente após a produção de $TNF\alpha$) está implicada na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB, contribuindo dessa forma para a sensibilização central subsequente através de mediadores adicionais.

Apesar da ausência de efeito do anticorpo nos 5 primeiros dias, quando administrado no local da lesão, o NGF parece ter uma participação importante na indução das respostas hipernociceptivas após a APB, quando se observa o proeminente efeito do anticorpo administrado sistemicamente e por via intratecal. Este dado nos leva a questionar se estes anticorpos, quando administrados sistemicamente, não estariam transpondo a barreira hematoencefálica e atuando em neurônios medulares. De fato, não é possível afirmar que a barreira hematoencefálica encontra-se rompida após a APB. Entretanto, se for considerado que a lesão nervosa é seguida de uma resposta inflamatória, acompanhada de migração celular e da liberação de

mediadores (tais como BK e SP), é possível admitir que talvez esta barreira apresente suas funções alteradas.

Outro aspecto investigado foi o papel do fator neurotrófico GDNF após a APB. O GDNF é capaz de ativar um sistema único de receptores, um complexo composto por um receptor de tirosina quinase, c-Ret, e um receptor âncora GFR α (SAARMA, 2001). Todavia, o papel do GDNF como um neuromodulador na transmissão medular da dor é ainda controverso. Segundo Hoane e colaboradores (1999), a administração i.c.v. de GDNF promove hipernocicepção em ratos, enquanto que outros trabalhos demonstram que a injeção i.t. do anticorpo contra o GDNF reduz as respostas hiperalgésicas evocadas pelo adjuvante completo de Freund (CFA) (FANG et al., 2003; AMAYA et al., 2004). Boucher et al. (2000) apontou o GDNF como sendo antinociceptivo em modelos de dor neuropática em ratos. Entretanto, estudos recentes demonstram que a injeção intratecal de GDNF é capaz de causar alterações nas fibras nociceptivas (JONJEN et al., 2005). Amaya e colaboradores (2004) demonstraram também que o aumento da expressão do receptor TRPV1 durante a inflamação periférica é decorrente do aumento nos níveis de GDNF nas fibras sensoriais.

Em nossos experimentos, o anticorpo anti-GDNF foi capaz de prevenir de forma consistente a hipernocicepção mecânica associada à APB, por um longo período de tempo (por até 20 dias) quando administrado localmente, sistemicamente (por até 14 dias) ou por via i.t. (por até 7 dias) no momento da cirurgia. Estes resultados nos permitem sugerir que o GDNF modula positivamente o desenvolvimento da hipernocicepção após a APB. Foi também demonstrado que a injeção i.c.v. de anticorpo anti-GDNF, no momento da cirurgia, não afetou significativamente as respostas hipernociceptivas secundárias à APB. Acredita-se que o GDNF é sintetizado e liberado imediatamente na periferia após a lesão nervosa, sendo então transportado

anterogradamente ao gânglio da raiz dorsal (DRG). Entretanto, o anticorpo contra o GDNF não foi capaz de interferir com a manutenção da hipernocicepção mecânica, já que não apresentou efeito quando administrado 4 dias após a cirurgia. Com base nestes achados, pode-se pressupor que o GDNF (produzido por tecidos periféricos) exerceria um papel crucial na gênese das respostas hipernociceptivas após a APB como um agente modulador, não nos permitindo afirmar que este fator neurotrófico é um mediador antinociceptivo. Estas conclusões são baseadas nos resultados obtidos com as administrações do GDNF diante de um quadro de hipernocicepção mecânica já instalada, as quais não tiveram efeito algum.

A neurotrofina NT-3 possui um papel essencial na sobrevivência neuronal sensorial e simpática durante o período de desenvolvimento (SNIDER, 1994). De maneira semelhante a outras neurotrofinas, a NT-3 é expressa em tecidos não-neuronais periféricos, tais como vasos sanguíneos e diferentes órgãos que recebem inervação simpática. A neurotrofina NT-3 é capaz de ativar os receptores TrkA e TrkB, em adição ao seu receptor preferencial TrkC (FRANCIS et al., 1999; KURUVILLA et al., 2004). A exemplo do GDNF, há dados controversos descrevendo os efeitos da neurotrofina NT-3 em estados nociceptivos, mas sabe-se que ocorre um aumento dos níveis de NT-3 nas células satélites do gânglio da raiz dorsal, após lesão nervosa periférica (ZHOU et al., 1999). No presente estudo, a hipernocicepção mecânica induzida pela APB foi inibida de forma marcante pela administração sistêmica ou i.t. do anticorpo anti-NT-3 e, de maneira mais discreta, pela aplicação local do anticorpo no momento da cirurgia. Por outro lado, a administração i.t. do anticorpo anti-NT-3, no 4º dia após a cirurgia, produziu apenas uma redução parcial da hipernocicepção mecânica. Em conjunto, estes resultados suportam a idéia de que a NT-3 está mais envolvida no processo de estabelecimento das alterações sensoriais mecânicas

induzidas pela APB, embora seu envolvimento na manutenção deste quadro não possa ser totalmente descartado.

A participação do BDNF nas respostas hipernociceptivas induzidas pela APB também foi avaliada no presente estudo. O BDNF encontra-se constitutivamente expresso em neurônios do DRG, especialmente em neurônios de pequeno e médio diâmetro, bem como em estruturas cerebrais (ALTAR et al., 1997). Entretanto, sua expressão pode ser aumentada após lesão direta do nervo periférico (KASHIBA e SENBA, 1999). Este fator neurotrófico tem sido reconhecido como um neuromodulador sensorial no corno dorsal da medula espinhal (THOMPSON et al., 1999). Algumas evidências têm demonstrado que tanto lesões neuronais periféricas, como centrais são acompanhadas por aumento dos níveis de BDNF nos terminais de neurônios periféricos e em neurônios na medula espinhal (SAH et al., 2003). É importante mencionar que o NGF é responsável pelo aumento da expressão de BDNF no DRG (FUKUOKA et al., 2001).

Nossos resultados corroboram os dados da literatura e estendem as evidências acerca da importância do BDNF nas neuropatias. Em nosso modelo, de maneira interessante, o anti-BDNF, administrado localmente, sistemicamente (i.p.) ou por via intratecal no momento da cirurgia, foi capaz de retardar o aparecimento da hipernocicepção mecânica. Estes efeitos podem ser relacionados com a capacidade do BDNF em agir na periferia ou de maneira parácrina, pois alguns neurônios do DRG expressam o receptor TrkB, o receptor de alta afinidade para o BDNF (KASHIBA et al., 1997). Surpreendentemente, a administração por via i.c.v do anticorpo anti-BDNF, no 4º dia após a cirurgia, inibiu expressivamente a hipernocicepção mecânica por até 20 dias após a APB. Por outro lado, o tratamento i.t. com o anticorpo anti-BDNF, no 4º dia,

foi capaz de reduzir a hipernocicepção mecânica apenas por 48 h após a administração.

De acordo com os resultados aqui apresentados, os efeitos do anticorpo anti-BDNF, administrado por via i.t., tanto no momento da cirurgia, quanto 4 dias após, foram completamente ausentes no 7º dia após a APB. É importante ressaltar que nenhuma inibição adicional foi observada quando um protocolo de injeções repetidas foi realizado (administração do anticorpo por via i.t. no momento da APB e no 4º dia pós-operatório, resultados não mostrados). Tais resultados nos levam a acreditar que um novo evento caracterizado pela expressão de outras proteínas possa estar mediando as respostas hipernociceptivas a partir do 7º dia.

Este grupo de resultados sugere que o BDNF ou o seu receptor podem estar aumentados em algumas estruturas do cérebro após a APB. Ademais, após a sua síntese, o BDNF derivado tanto do DRG como de neurônios cerebrais pode ser liberado e ativar neurônios sensoriais de segunda ordem (MICHAEL et al., 1997) ou estimular a fosforilação de receptores NMDA nos neurônios espinhais, um mecanismo bem estabelecido de sensibilização central (THOMPSON et al., 1999). Por esta razão, em contraste com os outros fatores neurotróficos estudados, além do papel significativo que exerce na gênese da hipernocicepção mecânica após a APB, o BDNF também parece ser crítico na manutenção do quadro.

Quanto ao tipo de receptor envolvido nas ações dos fatores neurotróficos, acredita-se que as respostas hipernociceptivas decorrentes da ação do NGF, BDNF e NT-3 sejam principalmente dependentes da ativação dos receptores TrKA, TrKB e TrKC, respectivamente. Atualmente, pouco se sabe acerca da relevância funcional do receptor p75^{NTR}. Entretanto, uma correlação entre o aumento na expressão do receptor p75^{NTR} e a morte neuronal tem sido estabelecida no córtex motor de ratos adultos.

Após axotomia, os neurônios corticoespinhais passam a expressar o receptor p75^{NTR}, 3 dias após a lesão, coincidindo com o tempo de ocorrência de morte celular (GIEHL et al., 2001). A Tabela 1 (SNIDER, 1994; BARBACID, 1995) demonstra o fenótipo de animais com alterações gênicas para as neurotrofinas e seus respectivos receptores. Como podemos observar, as alterações nociceptivas são observadas principalmente em animais com deficiência de NGF e do receptor TrkA. Poucas alterações sensoriais foram observadas nos animais deficientes para o receptor p75^{NTR}. Nenhuma alteração nociceptiva foi encontrada nos animais com deleção gênica para o BDNF, NT-3, TrkB ou TrkC. Entretanto, com base nos dados apresentados neste trabalho, podemos inferir que em estados patológicos estas neurotrofinas aparentemente têm um importante papel na modulação das vias sensoriais.

Tabela 1: Deficiências observadas no animais com deleção gênica para as neurotrofinas e seus receptores. *Adaptado de Snider (1994) e Barbacid (1995)*

| Fenótipo | p75^{NTR} | NGF | TrkA | BDNF | TrkB | NT-3 | TrkC |
|---------------------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
| <i>Perda neuronal</i> | alguma | severa | severa | severa | severa | marcante | marcante |
| Gânglio cervical superior | não | 95 % | 95 % | não | não | 50 % | 25 % |
| Gânglio trigeminal | não | 70 % | 70 % | 40 % | 90 % | 60 % | ? |
| Gânglio nodoso / petroso | ? | não | não | 85 % | ? | 40 % | ? |
| Gânglio vestibular | ? | ? | ? | 30 % | 30 % | 20 % | ? |
| DRG | sim | 70 % | 70 % | não | não | 65 % | 20 % |
| <i>Função</i> | | | | | | | |
| Nocicepção | parcial | fraca | fraca | normal | normal | normal | normal |
| Equilíbrio | normal | normal | normal | pouca | ? | normal | normal |
| Propriocepção | normal | normal | normal | normal | normal | pouca | Pouca |

Dados da literatura apontam os receptores B₁ e B₂ para cininas como outros alvos da ação do TNF α em lesões de nervos periféricos e processos inflamatórios

persistentes (para revisão ver: LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Lee e colaboradores (2002) demonstraram que o NGF foi o fator mais importante para o aumento na expressão do receptor B₂ das cininas após lesão nervosa periférica. Ademais, estudos realizados com cultura de células do DRG demonstraram que o fator neurotrófico GDNF foi capaz de aumentar a expressão funcional do receptor B₁ para cininas em aproximadamente 20 % da população neuronal total e, que o aumento na expressão do receptor já era observado durante o processo de dissecação do DRG (VELLANI et al 2004). Com base nestes experimentos, os autores sugerem que o GDNF liberado de células do tecido vizinho, em conjunto com células inflamatórias, poderia agir sobre o neurônio periférico lesionado, modulando a expressão do receptor B₁. Acredita-se ainda que este fator neurotrófico seja responsável pelo balanço entre as populações de receptores B₂ e B₁.

O papel das cininas nas respostas nociceptivas em animais já está bem estabelecido, há mais ou menos duas décadas (para revisão ver: CALIXTO et al., 2000; 2001; 2004; CAMPOS et al., 2006; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Atualmente, a ativação do receptor B₂ tem sido relacionada com a fase inicial da dor inflamatória, enquanto a estimulação do receptor B₁ estaria associada com processos patológicos mais persistentes. De fato, o aumento nos níveis de RNAm para o receptor B₁, ou da proteína, foi descrito no DRG após lesão por constrição do nervo ciático em ratos e camundongos (PETERSEN et al., 1998; ECKERT et al., 1999; LEVY e ZOCHODNE, 2000; YAMAGUCHI-SASE et al., 2003; RASHID et al., 2004). Walker et al. (1995) já afirmavam a existência de componentes do sistema caliceína-cininas no SNC, em regiões como córtex, tronco encefálico, cerebelo e hipotálamo, o que seria condizente com a atuação das cininas no controle central da dor. Foram evidenciadas também, concentrações razoáveis de BK na medula, cerebelo e córtex, bem como uma

densidade moderada de sítios de ligação para a BK no hipocampo (PERRY e SNYDER, 1984; KARIYA et al., 1985; FUJIWARA et al., 1989; COUTURE e LINDSEY, 2000). Petersen e colaboradores (1998) demonstraram que após a lesão parcial ou axotomia do nervo ciático ocorrem alterações na expressão de neuropeptídeos e de receptores para cininas em neurônios do DRG. Ademais, em estudos *in vitro*, o aumento na expressão de receptores B₁ e B₂ para cininas parece estar relacionado com a interação da neurotrofina NGF com o receptor p75^{NTR} (PETERSEN et al., 1996). Todas estas alterações ocorrem tanto no lado ipsilateral à lesão, como também no lado contralateral. Estas mudanças parecem ter como pré-requisito a lesão nervosa, uma vez que em animais falso-operados não ocorre aumento na expressão destes receptores (PETERSEN et al., 1998). Levy e Zochodne (2000) demonstraram que a lesão nervosa periférica está associada com o aumento na expressão do mRNA para os receptores B₁ e B₂ nos DRG, apesar da existência de receptores de forma constitutiva. Ainda, os mesmos autores relataram o aumento da expressão destes receptores no lado contralateral à lesão. Estes dados, juntamente com evidências comportamentais, permitem sugerir que os receptores cininérgicos estão envolvidos no desenvolvimento e na manutenção da hipersensibilidade térmica após a lesão nervosa. Mais recentemente, Rashid e colaboradores (2004) demonstraram a ocorrência da síntese *de novo* dos receptores B₁ para cininas após a lesão parcial do nervo ciático, principalmente em neurônios mielinizados do DRG, enquanto que a expressão dos receptores B₂ encontra-se reduzida. Dados da literatura relatam que os antagonistas para o receptor B₂ são capazes de causar redução significativa, porém em menor grau do que a induzida por antagonistas do receptor B₁, no modelo de hiperalgesia mecânica ipsilateral induzida pela injeção de CFA (PERKINS et al., 1993; BURGESS et al., 2000). Entretanto, outros autores demonstraram que a hiperalgesia térmica

induzida pela injeção intraplantar de CFA não foi modificada em animais com deleção gênica para o receptor B₂ (RUPNIAK et al., 1997). Resultados similares foram obtidos por Ferreira et al. (2001), onde animais com deficiência do receptor B₂ apresentaram essencialmente o mesmo comportamento hipernociceptivo após a injeção de CFA, em relação aos animais selvagens. Estes resultados foram confirmados através da utilização do antagonista seletivo para o receptor B₂, HOE-140. Outro fato interessante é que a resposta hiperalgésica induzida pelo agonista seletivo do receptor B₁, a des-Arg⁹-BK, é potencializada em animais com deleção gênica para o receptor B₂, em comparação com animais selvagens (FERREIRA et al., 2002). Estes dados reforçam a hipótese de que pode ocorrer um aumento compensatório na expressão do receptor B₁ em animais com deleção gênica para o receptor B₂ (MADEDDU et al., 1997; DUKA et al., 2001).

De forma interessante, no presente estudo, animais com deleção gênica dos receptores B₂ apresentaram uma redução discreta, embora significativa, das respostas hipernociceptivas mecânicas após a APB, um efeito que foi observado apenas em dois intervalos de tempo (4^o e 7^o dia após a cirurgia). Entretanto, não houve redução significativa da hipernocicepção térmica, em comparação aos animais-selvagens operados. Estas observações sugerem que, diferentemente dos outros modelos, este receptor não parece exercer papel primordial para a instalação do quadro neuropático induzido pela APB em camundongos. Estendendo estes dados, a administração do antagonista para o receptor B₂, HOE-140, tanto no momento da cirurgia, quanto 4 dias após, não foi capaz de alterar as respostas hipernociceptivas induzidas pela APB. Além disso, não foi observada também diferença significativa entre a expressão deste receptor na medula espinhal de camundongos submetidos à APB (4 dias após a cirurgia), quando comparados com animais falso-operados.

Pesquero e colaboradores (2000) desenvolveram uma interessante ferramenta que veio auxiliar no entendimento do papel dos receptores B₁ para cininas nas diferentes doenças, inclusive nos processos nociceptivos. Camundongos com deficiência no receptor B₁ apresentaram hipoalgesia em modelos químicos de nocicepção, provavelmente relacionada com uma redução da facilitação dependente de atividade (*Wind-up*) dos reflexos espinhais nociceptivos (PESQUERO et al., 2000). Os dados do presente estudo mostram claramente que o receptor B₁ desempenha um papel crítico no estabelecimento do comportamento hipernociceptivo causado pela APB, o que pode ser evidenciado pela completa ausência das respostas hipernociceptivas mecânica e térmica nos animais com deleção gênica para este receptor. Ma et al. (2000) e Wotherspoon e Winter (2000) relataram a presença de receptores B₁ constitutivos em neurônios sensoriais de ratos e camundongos, podendo justificar desta forma a redução das respostas nociceptivas nos animais com deleção gênica para o receptor B₁, já nos intervalos de tempo iniciais após a APB.

A participação do receptor B₁ para cininas foi demonstrada anteriormente em modelos de dor inflamatória persistente, onde animais com deleção gênica para o receptor B₁ apresentaram redução na sensibilidade térmica ipsilateral à injeção de CFA. Além do mais, a deleção gênica dos receptores B₁ também parece modular as alterações nociceptivas na pata contralateral. O mesmo foi confirmado utilizando o antagonista seletivo para o receptor, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (FERREIRA et al., 2001). Estes dados confirmam o importante papel do receptor B₁ na modulação de estados nociceptivos persistentes. Resultados semelhantes foram observados em modelos de hiperalgesia após a indução de diabetes por estreptozotocina em camundongos, onde antagonistas seletivos para o receptor B₁ foram capazes de inibir a hiperalgesia térmica (GABRA e SIROIS, 2002; 2003).

Foi demonstrado que a exacerbação da hiperalgesia térmica em animais diabéticos, através da administração de agonistas do receptor B₁, parece envolver a liberação de neuropeptídeos como substância P e CGRP, bem como a indução da enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzida) (GABRA e SIROIS, 2004). Outros dados da literatura demonstram que o antagonista seletivo para o receptor B₁, R-715, é capaz de reduzir de forma significativa as respostas nociceptivas de origem inflamatória (GABRA e SIROIS, 2003) e, que o potente antagonista não-peptídico seletivo para o receptor B₁ (ativo por via oral), o recentemente sintetizado SSR240612, é eficaz em prevenir a hipernocicepção térmica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em ratos (GOUGAT et al., 2004). Os dados do presente trabalho demonstram que a administração local ou sistêmica de ambos os antagonistas dos receptores B₁, R-715 e SSR241206, preveniu de maneira significativa a hipernocicepção mecânica induzida pela APB (por até 10 dias após a avulsão), quando aplicados no momento da cirurgia. Estes resultados novamente a relevância do receptor B₁ no sítio da lesão para o estabelecimento do quadro hipernociceptivo neste modelo de dor neuropática.

Há evidências de que, em modelos de constrição crônica do nervo ciático, a administração de antagonistas seletivos para os receptores B₁ ou B₂ reduz a hipersensibilidade mecânica, sugerindo o envolvimento das cininas e seus receptores no período mais tardio da hipersensibilidade (YAMAGUCHI-SASE et al., 2003). O mesmo foi observado no presente estudo com a administração de R-715 ou SSR240612 por via intraperitoneal, espinhal ou i.c.v. no 4º dia após a cirurgia. O papel do receptor B₁ frente a um quadro de hipersensibilidade já instalada parece envolver não somente o sítio da lesão, mas, também, provavelmente, sítios espinhais e supra-espinhais. O aumento da expressão do receptor B₁ para cininas no tecido da medula espinhal de camundongos submetidos à APB, obtido através da técnica de Western

blot, confirmam a hipótese do envolvimento de vias espinhais no controle da hipernocicepção no 4º dia após a cirurgia. Ademais, foi também observado níveis aumentados de RNAm para este receptor, em relação aos animais falso-operados, no hipotálamo, tálamo e córtex (estruturas conhecidas por participarem do processo de percepção, aprendizado, proteção e controle endógeno da dor) de animais submetidos à APB, confirmando o possível envolvimento de estruturas supraespinhais no controle da hipernocicepção neste modelo de dor neuropática. Desta maneira, estes dados nos permitem sugerir que a perpetuação do quadro neuropático após a APB dependeria, pelo menos em parte, do aumento da expressão dos receptores B₁ para cininas em estruturas centrais relacionadas ao controle da dor.

Ferreira et al. (2005) demonstraram que a deleção gênica do receptor B₁ é capaz de praticamente abolir a hipersensibilidade nociceptiva produzida pela constrição parcial do nervo ciático. Nesse mesmo estudo, os autores observaram também que o RNAm para o receptor B₁ é expresso de forma constitutiva em algumas estruturas importantes para a detecção, transmissão e a modulação da dor, incluindo o tecido da superfície plantar, o nervo ciático, a medula espinhal e o córtex cerebral de camundongos. Ademais, o envolvimento do receptor B₁ em estados neuropáticos foi confirmado pelo aumento da expressão do RNAm para o receptor B₁ no 7º dia após a constrição parcial do nervo ciático, no tecido da pata ipsilateral à constrição, no nervo ciático e na medula espinhal. Um fato interessante é que o receptor B₁, ao contrário do receptor B₂, não sofre dessensibilização, podendo ser responsável pela manutenção do quadro nociceptivo persistente (PRADO et al., 2002). Neste contexto, outro objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento dos receptores B₁ em fases mais tardias da hipernocicepção causada pela APB. Para tanto, os antagonistas para o receptor B₁ foram administrados por diferentes vias no 30º dia após a cirurgia. É possível sugerir

que o envolvimento do receptor B₁ passa a ser especialmente importante em estruturas cerebrais e não mais em sítios periféricos e espinhais. Esta conclusão é baseada nos seguintes resultados: (1) a administração sistêmica dos antagonistas para o receptor B₁ (30 dias após a APB) não foi capaz de alterar de forma significativa a hipernocicepção mecânica induzida pela APB; (2) o tratamento com os antagonistas seletivos para o receptor B₁ por via i.t. produziu apenas uma alteração parcial das respostas hipernociceptivas; (3) a administração i.c.v dos antagonistas para o receptor B₁ foi capaz de reduzir de maneira significativa e duradoura a hipernocicepção mecânica observada após a APB em camundongos (por até 6 h após o tratamento); (4) foi observado o aumento na expressão do receptor B₁ na medula e nos níveis de RNAm para este receptor em diferentes estruturas do cérebro (hipotálamo, tálamo e córtex) 4 dias após a cirurgia.

Os dados obtidos neste estudo contribuem com dados já descritos na literatura, onde as lesões nervosas têm sido freqüentemente associadas à liberação de citocinas, tais como TNF α e IL-1 β (WOOLF et al., 1997), que por sua vez podem aumentar a expressão periférica de NGF e GDNF (HEUMANN et al., 1987; HOKE et al., 2000). Estes mesmo fatores neurotróficos demonstraram ter um importante papel no processo de instalação das respostas hipernociceptivas induzidas pela APB. Sabe-se ainda que o NGF é capaz de sensibilizar nociceptores de maneira indireta, por estimular a liberação de outros mediadores inflamatórios (tais como BK, prostaglandina e histamina) a partir de mastócitos (HEFTI et al., 2005). De maneira interessante, evidências recentes mostram que o GDNF está envolvido no aumento da expressão de receptores B₁ para cininas, contribuindo assim para a perpetuação da hipernocicepção (VELLANI et al., 2004). Por fim, o NGF liberado no sítio da lesão pode ser transportado para o DRG, promovendo aumento da expressão de BDNF (APFEL et al., 1996) e

reduzindo o limiar do reflexo nociceptivo espinhal. Nossos resultados nos permitem sugerir que as citocinas pró-inflamatórias, em particular o $\text{TNF}\alpha$, em conjunto com os fatores neurotróficos NGF e GDNF exercem um papel fundamental na instalação do quadro hipernociceptivo. Estes mediadores parecem iniciar uma cascata de eventos responsáveis pelo desenvolvimento das respostas nociceptivas observadas no modelo de APB, através da modulação de uma ou mais vias de controle da dor. Por outro lado, o fator neurotrófico BDNF e o receptor B_1 para cininas parecem também estar relacionados principalmente com a manutenção da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. A Figura 28 sugere as possíveis formas de participação destes mediadores nas 3 principais fases envolvidas na dor neuropática, (1) as alterações iniciais decorrentes da lesão do nervo periférico, (2) o processo de sensibilização de neurônios medulares e (3) alterações plásticas envolvendo estruturas supra-espinhais do controle da dor.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que a APB em camundongos constitui um novo modelo de dor neuropática persistente, podendo ser uma ferramenta valiosa para o entendimento dos mecanismos envolvidos na etiologia destas doenças, bem como na investigação de novas drogas para o tratamento de neuropatias periféricas. Nossos resultados em conjunto com dados descritos na literatura ressaltam a relevância da citocina $\text{TNF}\alpha$ e de fatores neurotróficos na gênese da hipernocicepção mecânica induzida pela APB em camundongos. Além disso, podemos sugerir que o fator neurotrófico BDNF e o receptor B_1 para cininas estão intimamente envolvidos com o processo de manutenção das respostas hipernociceptivas observadas neste modelo. Considerando que a terapia atual necessita de drogas efetivas e seguras para o tratamento da dor neuropática, os alvos investigados neste estudo podem representar valiosas estratégias farmacológicas que

provavelmente receberão muita atenção por parte de pesquisadores e de indústrias farmacêuticas mundiais.

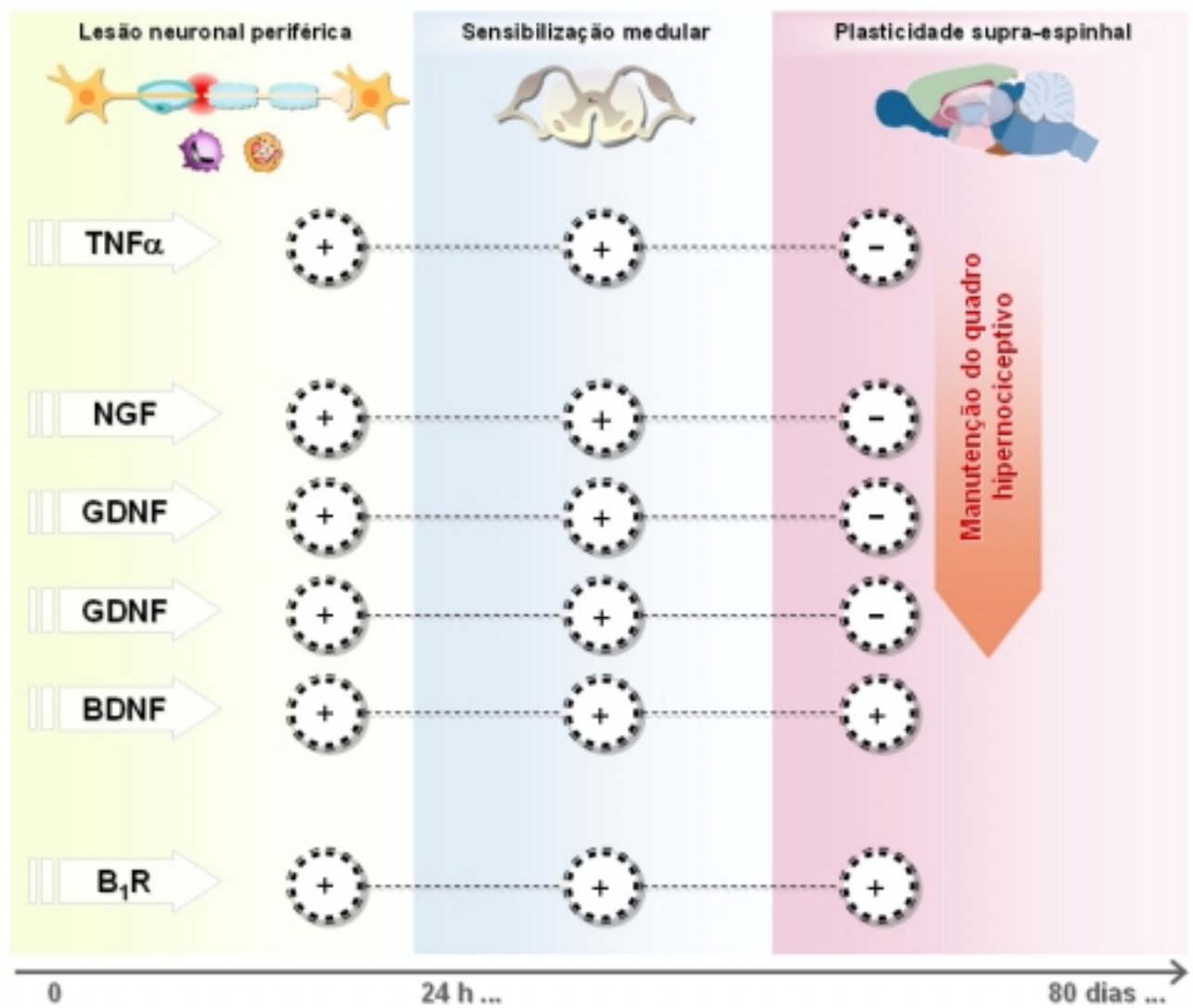


Figura 28. Proposta para os possíveis mecanismos envolvidos na gênese e na manutenção das respostas hipernociceptivas induzidas pela APB em camundongos.

Logo após a APB parece ocorrer a liberação de TNF α , que por sua vez, faria com que células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) migrassem para o sítio da lesão, secretando mais TNF α . Esta citocina poderia também ser responsável pela liberação de fatores neurotróficos de células inflamatórias após a APB, tais como NGF, GDNF e NT-3. O NGF participa da degeneração do nervo periférico lesionado, do aumento na expressão de BDNF no DRG, bem como de sensibilizar diretamente fibras aferentes periféricas ipsilateral a lesão. O GDNF também parece participar do processo de sensibilização das fibras nociceptivas, através do aumento nos níveis da expressão do receptor B₁ para cininas. A neurotrofina NT-3, apesar de desempenhar um papel mais discreto na hipernocicepção induzida pela APB, poderia estar envolvida nas possíveis alterações plásticas medulares. É possível que o aumento nos níveis de BDNF leve à sensibilização medular e central através da ativação do receptor NMDA. Esta sensibilização parece ocorrer antes de 24 h após a lesão, uma vez que alterações sensoriais são observadas no 1º dia após a APB. Além do BDNF, o receptor B₁ para cininas parecer ter uma participação importante na manutenção deste processo hipernociceptivo, através da sensibilização das vias supra-espinhais do controle da dor, fazendo com que estas alterações sejam observadas por um longo intervalo de tempo. Evidências da participação (+); Sem evidências da participação (-).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELOUS, J.E. e BARDIER, E.. Les substances hipotensives de l'urine humaine normale. **C.R. Senaces Soc. Biol.** v. 66, p. 511, 1909.
- AGGARWAL, B.B.; SAMANTA, A.; FELDMANN, M.. TNF α . **Cytokine Reference.** v. 1, p. 413-434, 2001a.
- AGGARWAL, B.B.; SAMANTA, A.; FELDMANN, M.. TNF receptors. **Cytokine Ref.** v. 2, p. 1619-1632, 2001b.
- AHLUWALIA, A.; PERRETI, M.. B1 receptors as new inflammatory target. Could this B the 1? **Trend Pharmacol. Sci.** v. 20, p. 100-104, 1999.
- ALEY, K.O. e LEVINE, J.D.. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. **Neurosci.** v. 111, n. 2, p. 389-397, 2002.
- ALEY, K.O.; MESSING, R.O.; MOCHLY-ROSEN, D.; LEVINI, J.D.. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isoenzyme of protein kinase C. **J. Neurosci.** v. 20, p. 4680-4685, 2000.
- ALTAR, C.A.; CAI, N.; BLIVEN, T.; JUHASZ, M.; CONNER, J.M.; ACHESON, A.L.; LINDSAY, R.M.; WIEGAND, S.J.. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. **Nature.** v. 389, p. 856-860, 1997.
- AMAYA, F.; SHIMOSATO, G.; NAGANO, M.; UEDA, M.; HASHIMOTO, S.; TANAKA, Y.; SUZUKI, H.; TANAKA, M.. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. **Eur. J. Neurosci.** v. 20, p. 2303-2310, 2004.
- ANAND, P. e BIRCH, R.. Restoration of sensory function and lack of long-term chronic pain syndromes after brachial plexus injury in human. **Brain.** v. 125, p. 113-122, 2002.
- ANDRADE, S.O. e ROCHA E SILVA, M.. Purification of bradykinin by ion exchange chromatography. **Biochem. J.** v. 64, p. 701-705, 1956.
- APFEL, S.C.. Neurotrophic factors in peripheral neuropathies: therapeutic implications. **Brain Pathol.** v. 9, p. 393-413, 1999.

- APFEL, S.C.; WRIGHT, D.E.; WIIDEMAN, A.M.; DORMIA, C.; SNIDER, W.D.; KESSLER, J.A.. Nerve growth factor regulates the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the peripheral nervous system. **Mol. Cell. Neurosci.** v. 7, p. 134-142, 1996.
- ARMSTRONG, D.. **Pain. Handbook of experimental pharmacology. XXV. Bradikinin, kallidin and kallikrein.** (eds Erdos, E.G.; Wild, A.F.) 434-481 (Berlim: Springer), 1970.
- ARRUDA, M.S.; RICHINI, V.B.; OLIVEIRA, S.M.; VILANI-MORENO, F.R.. Experimental murine mycobacteriosis: evaluation of the functional activity of the alveolar macrophages in thalidomide-treated mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 37, p. 485-492, 2004.
- ASHBURN, M.A. e STAATS, P.S.. Management of chronic pain. **Lancet.** v. 353, n. 9167, 1865-1869, 1999.
- ATTAL, N.. Chronic neuropathic pain: mechanisms and treatment. **Clin. J. Pain.** v. 16, S118-S130, 2000.
- BACKONJA, M. e GLANZMAN, R.L.. Gabapentin for neuropathic pain: Evidence from randomized placebo-controlled clinical trials. **Clin. Therap.** v. 25; p. 81-104, 2003.
- BARDE, Y.A.; EDGAR, D.; THOENEN, H.. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **EMBO J.** v. 1, p. 549-553, 1982.
- BARNACID, M.. Neurotrophic factors and their receptors. **Cur. Opin. Cell Biol.** v. 7, p. 148-155, 1995.
- BARNES, P.J. e KARIN, M.. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New Engl. J. Méd.** v. 336, p. 1066-1071, 1997.
- BARON, R.. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. **Clin. J. Pain.** v. 16, p. s12-s20, 2000.
- BASBAUM, A.E. e JESSEL, T.M.. The perception of pain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **The principles of Neural Science.** 4ed. McGraw-Hill: Nova Iorque, p. 472-791, 2000.
- BAUD, V. e KARIN, M.. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol.** v. 11, n. 9, p. 372-377, 2001.

- BAUMGÄRTNER, U.; MAGERL, W.; KLEIN, T.; HOPF, H.C.; TREEDE, R.D..
Neurogenic hyperalgesia versus painful hypoalgesia: two distinct mechanisms of neuropathic pain. **Pain**. v. 96, n. 1-2, p. 141-151, 2002.
- BEAUBIEN, G.; ROSINSKI-CHUPIN, I.; MATTEI, M.G.; MBIKAY, M.; CHRETIEN, M.; SAIDAH, N.G.. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. **Biochem**. v. 30, p. 1628-1635, 1991.
- BENNETT, G.J.. Does a neuroimmune interaction contribute to the genesis of painful peripheral neuropathies? **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 96, p. 7737-7738, 1999.
- BENNETT, G.J. e XIE, Y.K.. A peripheral mononeuropathy in rat produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**. v. 33, p. 87-107, 1988.
- BERMAN, J.S.; BIRCH, R.; ANAND, P.. Pain following human brachial plexus injury with spinal cord root avulsion and the effect of surgery. **Pain**. v. 75, p. 199-207, 1998.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**. v. 353, n. 9164, p. 1610 – 1615, 1999.
- BESSOU, P. e PERL, E.R.. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **J. Neurophysiol**. v. 32, n. 6, p. 1025-1043, 1969.
- BHoola, K.D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K.. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol. Rev**. v. 44, p. 1-44, 1992.
- BLAUKAT, A.. Structure and signaling pathways of kinin receptors. **Andrologia**. v. 35, p. 17-23, 2003.
- BOISSONAS, R.A.; GUTTMANN, S.; JAQUENOU, P.A.. Synthèse de la L-arginyl-L-propyl-L-propyl-glycyl-L-phénylalaninyl-L-arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. **Helv. Chim. Acta**. v. 43, p. 1349-1358, 1960.
- BOLAY, H. e MOSKOWITZ, M.A.. Mechanisms of pain modulation in chronic syndromes. **Neurology**. v. 59, p. 2-7, 2002.
- BORTOLANZA, L.B.; FERREIRA, J.; HESS, S.C.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur. J. Pharmacol**. v. 453, p. 203-208, 2002.

- BOUCHER, T.J.; OKUSE, K.; BENNETT, D.L.; MUNSON, J.B.; WOOD, J.N.; MCMAHON, S.B.. Potent analgesic effect of GDNF in neuropathic pain states. **Science**. v. 290, p. 124-127, 2000.
- BURGESS, G.M.; PERKINS, M.N.; RANG, H.P.; CAMOBELL, E.A.; BROWN, M.C.; MCINTYRE, P.; URBAN, L.; DZIADULEWCZ, E.K.; RITCHIE, T.J.; HALLET, A.; SNELL, C.R.; WRIGLESWORTH, R.; LEE, W.; DAVIS, C.; PHAGOO, S.B.; DAVIS, A.J.; PHILLIPS, E.; DRAKE, G.S.; HUGHES, G.A.; DUNSTAN, A.; BLOOMFIELD, G.C.. Bradyzide, a potent non-peptide receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** v. 129, p. 77-86, 2000.
- CAHILL, C.M.; DRAY, A.; CODERRE, T.J.. Intrathecal nerve growth factor restores opioid effectiveness in an animal model of neuropathic pain. **Neuropharmacol.** v. 45, p. 543-552, 2003.
- CALABRESE, L. e FLEISCHER, A.B.. Thalidomide: current and potential clinical applications. **Am. J. Med.** v. 108, p. 487-495, 2000.
- CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A.. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res.** v. 14, n. 6, p. 401 – 418, 2000.
- CALIXTO, J.B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S.. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drug. **Expert. Opin. Emerging Drugs**. v. 6, p. 261-279, 2001.
- CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, E.S.; FERREIRA, J.; CABRINI, D.; CAMPOS, M.M.. Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br. J. Pharmacol.** v. 143, p. 803-818, 2004.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B.. In vivo B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement o protein kinases and nuclear factor κ B pathways. **Br. J. Pharmacol.** v. 127, p. 1851-1859, 1999.
- CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.; RICCI, N.D.; PESQUERO, J.L.; TEIXEIRA, M.M.; CALIXTO, J.B.. The role of migrating leucocytes in IL-1 β -induced up-regulation of kinin B₁ receptors in rats. **Br. J. Pharmacol.** v. 135, p. 1107-1114, 2002.

- CAMPOS, M.M.; LEAL, P.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.. Non-peptide antagonists for kinin B(1) receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. **Trends Pharmacol. Sci.** epub ahead of print, 2006.
- CARLSTEDT, T.; ANAND, P.; HALLIN, R.; MISRA, P.V.; NOREN, G.; SEFERLIS, T.. Spinal nerve root repair and reimplantation of avulsed ventral roots into the spinal cord after brachial plexus injury. **J. Neurosurg.** v. 93, p. 237-247, 2000.
- CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B.. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumour. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 72, p. 3666-3670, 1975.
- CARVALHO, G.A.; NIKKHAH, G.; SAMII, M.. Pain management after post-traumatic brachial plexus lesions. Conservative and surgical therapy possibilities. **Orthopade.** v. 26, p. 621-625, 1997.
- CHAO, M.V.. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 4, p. 299-309, 2003.
- COHEN, S.. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 46, p. 302-311, 1960.
- CORRÊA, C.R. e CALIXTO, J.B.. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. **Br. J. Pharmacol.** v. 110, p. 193-198, 1993.
- CORREALE, J. e VILLA, A.. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. **J. Neurol.** v. 251, p. 1304-1316, 2004.
- COUTURE, R. e LINDSEY, C.J.. **Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions.** In: Quirion, R.; Brörklund, A.; Hökfeld, T. Handbook of Chemical Anatomy. v. 16, Peptide receptors, part 1. Holanda: Elsevier, p. 241-298, 2000.
- COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R.M.; CLOUTIER, F.. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur. J. Pharmacol.** v. 429, p. 161-176, 2001.
- COVEY, W.C.; IGNATOWSKI, T.A.; RENAULD, A.E.; KNIGHT, P.R.; NADER, N.D.; SPENGLER, R.N.. Expression of neuron-associated tumor necrosis factor alpha in

the brain is increased during persistent pain. **Reg. Anesth. Pain Med.** v. 27, n. 4, p. 357-366, 2002.

CRUWYS, S.C.; GARRETT, N.E.; PERKINS, M.N.; BLAKE, D.R.; KIDD, B.L.. The role of bradykinin B1 receptors in the maintenance of intra articular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. **Br. J. Pharmacol.** v. 113, p. 940–944, 1994.

CUI, J.G.; HOLMIN, S.; MATHIESEN, T.; MEYERSON, B.A.; LINDEROTH, B.. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain.** v. 88, p. 239-248, 2000.

CUNHA, T.M.; VERRI JR, W.A.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

D'AMOUR, F.E. e SMITH, J.A.. A method for determine loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 72, p. 74-79, 1941.

DECOSTERD, I. e WOOLF, C.J.. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain.** v. 87, p. 149-158, 2000.

DENDORFER, A.; WOLFRUM, S.; DOMINIAK, P.. Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system. **Jpn. J. Pharmacol.** v. 79, p. 403-426, 1999.

DOGRUL, A.; GARDELL, L.R.; OSSIPOV, M.H.; TULUNAY, F.C.; LAI, J.; PORRECA, F.. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. **Pain.** v. 105, n. 1-2, p. 159-168, 2003.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A.. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 15, n. 6, p. 190-197, 1994.

DRAY, A. e PERKINS, M.. Kinins and pain. In: Farmer SG. **The handbook of immunopharmacology: the kinin system**. Academic press: London, p. 157-172, 1997.

DUKA, I.; KINTSURASHVILI, E.; GAVRAS, I.; JOHNS, C.; BRESNAHAN, M.; GAVRAS, H.. Vasoactive potential of the B1 bradykinin receptor in normotension and hypertension. **Circ. Res.** v. 88, p. 275–281, 2001.

- DUNHAM, N.W. e MIYA, T.S.. A note on a simple apparatus for detecting neurobiological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.** v. 46, p. 208-209, 1957.
- ECKERT, A.; SEGOND VON BANCHET, G.; SOPPER, S.; PETERSEN, M.. Spatio-temporal pattern of induction of bradykinin receptors and inflammation in rat dorsal root ganglia after unilateral nerve ligation. **Pain.** v. 83, p. 487-497, 1999.
- ERICHSEN, H.K. e BLACKBURN-MUNRO, G.. Pharmacological characterisation of the spared nerve injury model of neuropathic pain. **Pain.** v. 98, p.151-161, 2002.
- FAIRBANKS, C.A.; NGUYEN, H.O.; GROCHOLSKI, B.M.; WILCOX, G.L.. Moxonidine, a selective imidazoline- α 2-adrenergic receptor agonist, produces spinal synergistic antihyperalgesia with morphine in nerve-injured mice. **Anesthesiol.** v. 93, p. 765–773, 2000.
- FANG, M.; WANG, Y.; HE, Q.H.; SUN, Y.X.; DENG, L.B.; WANG, X.M.; HAN, J.S.. Glial cell line-derived neurotrophic factor contributes to delayed inflammatory hyperalgesia in adjuvant rat pain model. **Neurosci.** v. 117, p. 503-512, 2003.
- FELDMANN, M. e SAKLATVALA, J.. Proinflammatory cytokines. **Cytokine Ref.** v. 1, p. 291-305, 2001.
- FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, J.G.; PESQUERO, J.L.; AVELLAR, M.C.; TEIXEIRA, M.M.; CALIXTO, J.B.. Mechanisms underlying the modulatory action of platelet activating factor (PAF) on the upregulation of kinin B1 receptors in the rat paw. **Br. J. Pharmacol.** v. 139, n. 5, p. 973-981, 2003.
- FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PESQUERO, J.B.; ARAÚJO, R.C.; BADER, M.; CALIXTO, J.B.. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacol.** v. 41, p. 1006-1012, 2001.
- FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, R.C.; BADER, M.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B.. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacol.** v. 43, p. 1188-1197, 2002.

- FERREIRA, J.; BEIRITH, A.; MORI, M.A.S.; ARAÚJO, R.C.; BADER, M.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B.. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. **J. Neurosci.** v. 25, n. 9, p. 2405-2415, 2005a.
- FERREIRA, J.; TRICHES, K.M.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J.B.. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. **Pain.** v. 117, p. 171-181, 2005b.
- FRANCIS, N.; FARINAS, I.; BRENNAN, C.; RIVAS-PLATA, K.; BACKUS, C.; REICHARDT, L.; LANDIS, S.. NT-3, like NGF, is required for survival of sympathetic neurons, but not their precursors. **Dev. Biol.** v. 210, p. 411-427, 1999.
- FUCHS, P.N.; CAMPBELL, J.N.; MEYER, R.A.. Secondary hyperalgesia persists in capsaicin-desensitized skin. **Pain.** v. 84, p. 141-149, 2000.
- FUJIWARA, Y.; MANTIONE, C.R.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; YAMAMURA, H.I.. Characterization of (3H) bradykinin binding sites in guinea-pig central nervous system: possible existence of B2 subtypes. **Life Sci.** v. 44, p. 1645-1653, 1989.
- FUKUOKA, T.; KONDO, E.; DAI, Y.; HASHIMOTO, N.; NOGUCHI, K.. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. **J. Neurosci.** v. 21, n. 12, p. 4891-4900, 2001.
- FÜRST, S.. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.** v. 48, p. 129-141, 1999.
- GABRA, B.H. e SIROIS, P.. Role of bradykinin B1 receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. **Eur. J. Pharmacol.** v. 457, p. 115-124, 2002.
- GABRA, B.H. e SIROIS, P.. Beneficial effects of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice. **Peptides.** v. 24, p. 1131-1139, 2003.
- GABRA, B.H. e SIROIS, P.. Pathways for the bradykinin B1 receptor-mediated diabetic hyperalgesia in mice. **Inflamm. Res.** v. 53, p. 653-657, 2004.
- GALER, B.S.. Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. **Neurology.** v. 45, p.17-25, 1995.

- GALLUZZI, K.E.. Management of neuropathic pain. **JAOA**. v. 105, n. 9, p. s12-s19, 2005.
- GARCIA-MARCH, G.; SANCHEX-LEDESMA, M.J.; DIAZ, P.; YAGUE, I.; ANAYA, J.; GONÇALVES, J.; BROSETA, J.. Dorsal root entry zone lesions versus spinal cord stimulation in the management pain from brachial plexus avulsion. **Acta Neurochir**. v. 39, p.155-158, 1987.
- GEORGE, A.; MARZINIAK, M.; SCHÄFERS, M.; TOYKA, K.V.; SOMMER, C.. Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor- α , increases interleukine-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. **Pain**. v. 88, p. 267-275, 2000.
- GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C.. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. **Exp. Neurol**. v. 192, p. 163-166, 2005.
- GIEHL, K.M.; ROHRIG, S.; BONATZ, H.; GUTJAHR, M.; LEINER, B.; BARTKE, I.; YAN, Q.; REICHARDT, L.F.; BACKUS, C.; WELCHER, A.A.; DETHLEFFSEN, K.; MESTRES, P.; MEYER, M.. Endogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 antagonistically regulate survival of axotomized corticospinal neurons in vivo. **J. Neurosci**. v. 21, n. 10, p. 3492-3502, 2001.
- GORDON, D.B. e LOVE, G.. Phamacologic management of neuropathic pain. **Pain Managment Nursing**. v. 5, n. 4, p. 19-33, 2004.
- GOUGAT, J.; FERRARI, B.; SARRAN, L.; PLANCHENAU, C.; PONCELET, M.; MARUANI, J.; ALONSO, R.; CUDENNEC, A.; CROCI, T.; GUAGNINI, F.; URBAN-SZABO, K.; MARTINOLLE, J.J.; SOUBRIE, P.; FINANCE, O.; LE FUR, G.. SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-3-((6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl)amino)propanoyl)amino]-3-(4-([2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl)methyl)phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide Hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. **J. Pharmacol. Exp. Ther**. v. 309, p. 661-669, 2004.
- GRUBB, B.D.. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth**. v. 81, n. 1, p. 8-11, 1998.

- GUIMARÃES, J.A.; BORGES, B.R.; PRADO, E.S.; PRADO, J.L.. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. **Biochem. Pharmacol.** v. 22, p. 3157-3172, 1973.
- GUSTAFSSON, H.; FLOOD, K.; ODD-GEIR, B.; BRODIN, E.; OLGART, L.; STILLER, C-O.. Gabapentin reverses mechanical allodynia induced by sciatic nerve ischemia and formalin-induced nociception in mice. **Exp. Neurology.** v. 182, p. 427-434, 2003.
- GWAK, Y.S.; NAM, T.S.; PAIK, K.S.; HULSEBOSCH, C.E.; LEEM, J.W.. Attenuation of mechanical hyperalgesia following spinal cord injury by administration of antibodies to nerve growth factor in the rat. **Neurosci. Lett.** v. 336, p. 117-120, 2003.
- HALL, J.M. e MORTON, I.K.M.. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system.** Academic Press: London, p. 9-43, 1997.
- HANDWERKER, H.O. e REEH, P.W.. Algesimetry: a necessity in research on analgesic drugs. **Agents Actions Suppl.** v. 19, p. 33-49, 1986.
- HANESCH, U.; PAWLAK, M.; MCDOUGALL, J.J.. Gabapentin reduces the mechanosensitivity of fine afferent nerve fibers in normal and inflamed rat knee joints. **Pain.** v. 104, p. 363-366, 2003.
- HANSSON, P.T. e DICKENSON, A.H.. Pharmacological treatment of peripheral neuropathic pain conditions based on shared commonalities despite multiple etiologies. **Pain.** v. 113, p. 251-254, 2005.
- HARDEN, N. e COHEN, M.. Unmet needs in the management of neuropathic pain. **J. Pain Symptom Management.** v. 25, p. 12-17, 2003.
- HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J.. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain.** v.32, p.77-88, 1988.
- HATTORI, K.; HIRANO, T.; MIYAJIMA, H.; YAMAKAWA, N.; TATENO, M.; OSHIMI, K.; KAYAGAKI, N.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.. Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. **Blood.** v. 91, p. 4051-4055, 1998.

- HEFTI, F.F.; ROSENTHAL, A.; WALICKE, P.A.; WYATT, S.; VERGARA, G.; SHELTON, D.L.; DAVIES, A.M.. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 27, n. 2, p. 85-91, 2005.
- HELLMICH, H.L.; KOS, L.; CHO, E.S.; MAHON, K.A.; ZIMMER, A.. Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interaction. **Mec. Develop.** v. 54, p. 95-105, 1996.
- HENDERSON, C.E.; PHILLIPS, H.S.; POLLOCK, R.A.; DAVIES, A.M.; LEMEULLE, C.; ARMANINI, M.; SIMMONS, L.; MOFFET, B.; VANDLEN, R.A.; SIMPSON, L.C.. GDNF: a potent survival factor for moto-neurons present in peripheral nerve and muscle. **Science.** v. 266, p. 1062-1064, 1994.
- HEUMANN, R.; KORSCHING, S.; BANDTLOW, C.; THOENEN, H.. Changes of nerve growth factor synthesis in noneuronal cells in response to sciatic nerve transection. **J. Cell. Biol.** v. 104, p. 1623-1631, 1987.
- HOANE, M.R.; GULWADI, A.G.; MORRISON, S.; HOVANESIAN, G.; LINDNER, M.D.; TAO, W.. Differential in vivo effects of neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor. **Exp. Neurol.** v. 160, p. 235-243, 1999.
- HOKE, A.; CHENG, C.; ZOCHODNE, D.W.. Expression of glial cell-derived neurotrophic factor family of growth factors in peripheral nerve injury in rats. **NeuroReport.** v. 11, p. 1651-1654, 2000.
- HYLDEN, J.L. e WILCOX, G.L.. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur. J. Pharmacol.** v. 67, p. 313-316, 1980.
- IGNATOWSKI, T.A.; COVEY, W.C.; KNIGHT, P.R.; SEVERIN, C.M.; NICKOLA, T.J.; SPENGLER, R.N. Brain-derived TNF α mediates neuropathic pain. **Brain Res.** v. 84, p. 70-77, 1999.
- ILSE, W.K.. Neuropathic pain: Mechanisms, diagnosis and treatment. **Can. J. Continuing Med. Education.** v. 14, p. 99-108, 2002.
- JENSEN, T.S. e BARON, R.. Translation of symptoms and signs into mechanisms in Neuropathic pain. **Pain.** v. 102, p. 1-8, 2003.
- JENSEN, T.S.; GOTTRUP, H.; SINDRUP, S.H.; BACH, FLEMMING, W.B.. The clinical picture of Neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.** v. 429, p. 1-11, 2001.

- JOHNSON, D.; LANAHAN, A.; BUCK, C.R.; SEHGAL, A.; MORGAN, C.; MERCER, E.; BOTHWELL, M.; CHAO, M.. Expression and structure of the human NGF receptor. **Cell**. v. 47, p. 545-554, 1986.
- JONJEN, J.L.M.; HAASDIJK, E.D.; SABEL-GOEDKNEGT, H.; VAN DER BURG, J.; VECHT, CH.J.; HOLSTEGE, J.C.. Intrathecal injection of GDNF and BDNF induces immediate early gene expression in rat spinal dorsal horn. **Exp. Neurol.** v. 194, p. 255-266, 2005.
- JULIUS, D. e BASBAUM, A.I.. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.
- KAPLAN, D.R. e MILLER, F.D.. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr. Opin. Neurobiol.** v. 10, p. 381-391, 2000.
- KARIYA, K.; YAMAUCHI, A.; SASAKI, T.. Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. **J. Neurochem.** v. 44, p. 1892-1897, 1985.
- KASHIBA, H.; UEDA, Y.; UEYAMA, T.; NEMOTO, K.; SENBA, E.. Relationship between BDNF- and trk-expressing neurones in rat dorsal root ganglia: an analysis by in situ hybridization. **Neuroreport**. v. 8, p. 1229-1234, 1997.
- KASHIBA, H. e SENBA, E.. Up- and down-regulation of BDNF mRNA in distincts subgroups of rat sensory neurons after axotomy. **NeuroReport**. v. 10, p. 3561-3565, 1999.
- KIM, S.H. e CHUNG, J.M.. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**. v. 50, p. 355-363, 1992.
- KURUVILLA, R.; ZWEIFEL, L.S.; GLEBOVA, N.O.; LONZE, B.E.; VALDEZ, G.; YE, H.; GINTY, D.D.. A neurotrophin signalling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signalling. **Cell**. v. 118, p. 243-255, 2004.
- KVARNSTROM, A.; KARLSTEN, R.; QUIDING, H.; EMANUELSSON, B.M.; GORDTH, T.. The effectiveness of intravenous ketamine and lidocaine on peripheral neuropathic pain. **Acta Anaesthesiol. Scand.** v. 47, p. 868-877, 2003.
- LAURSEN, S.E. E BELKNAP, J.K.. Intracerebroventricular injections in mice: some methodological refinements. **J. Pharmacol. Methods**. v. 16, p. 355-357, 1986.

- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.** v. 53, p. 597-652, 2001.
- LEE, S.H.; KAYSER, V.; DESMEULES, J.; GUILBAUD, G.. Differential action of morphine and various opioid agonists on thermal allodynia and hyperalgesia in mononeuropathic rats. **Pain.** v. 57, n. 2, p. 233-240, 1994.
- LEE, Y.-J.; ZACHRISSON, O.; TONGE, D.A.; MACNAUGHTON, P.A.. Upregulation of bradykinin B2 receptor expression by neurotrophic factors and nerve injury in mouse sensory neurons. **Mol. Cell. Neurosci.** v. 19, p. 186-200, 2002.
- LEEB-LUNDBERG, L.M.; MARCEAU, F.; MÜLLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D.J.; ZURAW, B.L.. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol. Rev.** v. 57, n. 1, p. 27-77, 2005.
- LEIBROCK, J.; LOTTSPEICH, F.; HOHN, A.; HOFER, M.; HENGERER, B.; MASIAKOWSKI, P.; THOENEN, H.; BARDE, Y.A.. Molecular cloning and expression of brain derived neurotrophic factor. **Nature.** v. 341, p. 149-152, 1989.
- LEVINE, J.D.; FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J. Neurosci.** v. 13, p. 2273-2286, 1993.
- LEVI-MONTALCINI, R.. The nerve growth factor: thirty-five years later. **EMBO J.** v. 6, p. 1145-1154, 1987.
- LEVY, D. e ZOCHODNE, D.W.. Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. **Pain.** v. 86, p. 265-271, 2000.
- LI, L.; XIAN, C.J.; ZHONG, J.H.; ZHOU, X.F.. Lumbar 5 ventral root transaction-induced upregulation of nerve growth factor in sensory neurons and their target tissues: a mechanism in neuropathic pain. **Mol. Cell. Neurosci.** v. 23, p. 232-250, 2003.
- LIN, L.F.. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a comprehensive review. **Neural Notes.** v. 2, p. 3-7, 1996.
- LINDENLAUB, T.; TEUTEBERG, P.; HARTUNG, T.; SOMMER, C.. Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. **Brain Res.** v. 866, p. 15-22, 2000.

- LOESER, J.D.. Pain and suffering. **Clin. J. Pain.** v. 16, p. S2-S6, 2000.
- LOESER, J.D.. What's to be done? Comments on Grabow et al. **Clin. J. Pain.** v. 19, n. 6, p. 384, 2003.
- LOESER, J.D. e BLACK, R.G.. A taxonomy of pain. **Pain.** v. 1, p. 81-84, 1975.
- LOESER, J.D. e MELZACK, R.. Pain: an overview. **Lancet.**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.
- LOMBARD, M.C.; NASHOLD J.R., B.S.; ALBE-FESSARD, N.; SALMAN, C.; SAKR, N.. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. **Pain.** v. 6, p. 163–174, 1979.
- MA, Q.P. e WOOLF, C.J.. The progressive tactile hyperalgesia induced by peripheral inflammation in nerve growth factor dependent. **NeuroReport.** v. 8, p. 807-810, 1997.
- MA, Q.-P.; HILL, R.; SIRINATHSINGHJI, D.. Basal expression of bradykinin B1 receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. **NeuroReport.** v. 18, p. 4003-4005, 2000.
- MACEWAN, D.J.. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. **Cell Signal.** v. 14, p. 477-492, 2002.
- MACFARLANE, B.V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H.A.. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacol. Ther.** v. 75, p. 1-19, 1997.
- MACHADO, A.. **Neuroanatomia funcional.** Atheneu: São Paulo, p. 112-113, 2000.
- MADEDDU, P.; VARONI, M.V.; PALOMA, D.; EMANUELI, C.; DEMONSTIS, M.P.; GLORIOSO, N.; DESSI-FULGHERI, P.; SARZANI, R.; ANANIA, V.. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. **Circulation.** v. 96, p. 3570-3578, 1997.
- MAGERL, W.; FUCHS, P.N.; MEYER, R.A.; TREEDE, R.D.. Roles of capsaicin-insensitive nociceptors in cutaneous pain and secondary hyperalgesia. **Brain.** v. 124, n. Pt 9, p. 1754-1764, 2001.
- MALIK-HALL, M.; DINA, O.A.; LEVINE, J.D.. Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGF-induced mechanical hyperalgesia. **Eur. J. Neurosci.** v. 21, p. 3387-3394, 2005.

- MALMBERG, A.B. e BASBAUM, A.I.. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**. v. 76, n. 1-2, p. 215-222, 1998.
- MALMBERG, A.B. e YAKSH, T.L.. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**. v. 257, p. 1276-1279, 1992.
- MARCEAU, F.; HESS, J.F.; BACHVAROV, D.R.. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol. Rev.** v. 50, n. 3, p. 357-386, 1998.
- MARTIN, T.J. e EISENACH, J.C.. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 299, p. 811-817, 2001.
- MCALLISTER, A.K.; LO, D.C.; KATZ, L.C.. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. **Neuron**. v. 15, p. 791-803, 1995.
- MCMAHON, S.B. e PRIESTLEY, J.V.. Peripheral neuropathies and neurotrophic factors: animal models and clinical perspectives. **Curr. Opin. Neurobiol.** v. 5, p. 616-624, 1995.
- MCQUAY, H.J. e MOORE, R.A.. Antidepressants and chronic pain. **BMJ**. v. 314, n. 7083, p. 763-764, 1997.
- MENDELL, J.R. e SAHENK, Z.. Painful sensory neuropathy. **N. Engl. J. Med.** v. 348, p. 1243-1255, 2003.
- MENDELL, L.M.; ALBERS, K.M.; DAVIS, B.M.. Neurotrophins, nociceptors, and pain. **Micr. Res. Tech.** v. 45, p. 252-261, 1999.
- MENKE, J.G.; BOROWSKI, J.A.; BIERILKO, K.K.; MACNEIL, T.; DERRIC, A.W.; SCHENECK, K.A.; RANSOM, R.W.; STRADER, C.D.; LINEMEYER, D.L.; HESS, J.F.. Expression of cloning of a human B1 bradykinin receptor. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 21583-21586, 1994.
- MERSKEY, H.. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on Taxonomy. **Pain**. v. 6, p. 249-252, 1979.
- MICHAEL, G.J.; AVERILL, S.; NITKUNAN, A.; RATTRAY, M.; BENNETT, D.L.; YAN, Q.; PRIESTLEY, J.V.. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in

- their central terminations within the spinal cord. **J. Neurosci.** v. 17, p. 8476-8490, 1997.
- MILLAN, M.J.. The induction of pain: An integrative review. **Prog. Neurobiol.** v. 57, p. 1-164, 1999.
- MOOSY, J.J. e NASHOLD, B.S.JR.. Dorsal root entry zone lesion for conus medullaris root avulsions. **Appl. Neurophysiol.** v. 51, p. 198-205, 1988.
- MOREAU, M.E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A.. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J. Pharmacol. Sci.** v. 99, p. 6-38, 2005.
- MORELAND, L.W.; BAUMGARTNER, S.W.; SCHIFF, M.H.; TINDALL, E.A.; FLEISCHMANN, R.M.; WEAVER, A.L.; ETTLINGER, R.E.; COHEN, S.; KOOPMAN, W.J.; MOHLER, K.; WIDMER, M.B.; BLOSCHE, C.M.. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. **N. Engl. J. Med.** v. 337, p. 141-147, 1997.
- MURRAY, S.R.; CHAO, J.; LIN, F.; CHAO, L.. Kallikrein multigene families and the regulation of their expression. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 15, p. S7-S15, 1990.
- NAMAKA, M.; GRAMLICH, C.R.; RUHLEN, D.; MELANSON, M.; SUTTON, I.; MAJOR, J.. A treatment algorithm for neuropathic pain. **Clin. Therap.** v. 26, n. 7, p. 951-979, 2004.
- NICHOLSON, B.. Gabapentin use in neuropathic pain syndromes. **Acta. Neurol. Scand.** v. 101, p. 359-371, 2000.
- OKAMOTO, K.; MARTIN, D.P.; SCHMELZER, J.D.; MITSUI, Y.; LOW, P.A.. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Exp. Neurol.** v. 169, p. 386-391, 2001.
- ONDA, A.; MURATA, Y.; RYDEVIK, B.; LARSSON, K.; KIKUCHI, S.; OLMARKER, K.. Infliximab attenuates immunoreactivity of brain-derived neurotrophic factor in a rat model of herniated nucleus pulposus. **Spine.** v. 29, n. 17, p. 1857-1861, 2004.
- PARADA, C.A.; VIVANCOS, G.G.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 100, n. 5, p. 2923-2928, 2003.

- PAUL, A.T.; GOHIL, V.M.; BHUTANI, K.K.. Modulating TNF- α signaling with natural products. **Drug Disc. Today**. v. 11, n. 15, p. 725-732, 2006.
- PEREZ, C.; ALBERT, I.; DEFAY, K.; ZACHARIADES, N.; GOODING, L.; KRIEGLER, M.. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. **Cell**. v. 63, p. 251-258, 1990.
- PERKINS, M.N.; CAMPBELL, E.; DRAY, A.. Antinociceptive activity of the bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists, des-arg⁹,[leu⁸]-bk and hoe140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. **Pain**. v. 51, p. 191-197, 1993.
- PERKINS, N.M. e TRACEY, D.J.. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neurosci**. v. 101, n. 3, p. 745-757, 2000.
- PERRY, D.C. e SNIDER, S.H.. Identification of bradykinin in mammalian brain. **J. Neurochem**. v. 43, p. 1072-1080, 1984.
- PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPESTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA, J.A. JR; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.; CALIXTO, J.B.; LEWIN, G.R.; BADER, M.. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 97, p. 8140–8145, 2000.
- PETERSEN, M.; ECKERT, A.S.; SEGOND VON BANCHET, G.; HEPPELMANN, B.; KLUSCH, A.; KNIFFKI, K.-D.. Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in the sensory neurons after mechanical nerve injury. **Neurosci**. v. 83, n. 3, p. 949-959, 1998.
- PETERSEN, M.; SEGOND VON BANCHET, G.; HEPPELMANN, B.; KOLTZENBURG, M.. NGF regulates the expression of bradykinin binding sites on adult sensory neurons via the neurotrophin receptor p75. **Neurosci**. v. 83, p. 161-168, 1996.
- PEZET, S.; MALCANGIO, M.; MCMAHON, S.B.. BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? **Brain Res. Rev**. v. 40, p. 240-249, 2002.
- PITCHER, G.M.; RITCHIE, J.; HENRY, J.L.. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. **Pain**. v. 83, p. 37-46, 1999.
- PRADO, G.N.; TAYLOR, L.; ZHOU, X.; RICUPERO, D.; MIERKE, D.F.; POLGAR, P.. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. **J. Cell. Physiol**. v. 193, p. 275-286, 2002.

- POO, M.. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 2, p. 24-32, 2001.
- QUINTÃO, N.L.M.; MEDEIROS, R.; SANTOS, A.R.S.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.. Effects of diacerhein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice. **Anesth. Analg.** v. 101, n. 6, p. 1763-1769, 2005.
- RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.. in **Textbook of pain.** (eds Wall, P.D. e Melzack, R.), p. 11-57, (Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999).
- RAMER, M.S.; FRENCH, G.D.; BISBY, M.A.. Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting in to the DRG. **Pain.** v. 72, p. 71-78, 1997.
- RANKINE, J.J.. Adult traumatic brachial plexus injury. **Clin. Radiol.** v. 59, p. 767-774, 2004.
- RASHID, H.; INOUE, M.; MATSUMOTO, M.; UEDA, H.. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 308, p. 1158-1164, 2004.
- REGOLI, D. e BARABÉ, J.. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol. Rev.** v. 32, p. 1 - 46, 1980.
- REGOLI, D.; RHALEB, N-E.; DRAPEAU, G.; DION, S.. Kinin receptors subtypes. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 15, p. S30-S38, 1990.
- REGOLI, D.; GOBIEL, F.; NGUYEN, Q.T.; JUKIC, D.; SEONE, P.R.; SALVINO, J.M.; SAWUTZ, D.G.. Bradykinin receptor types and B2 subtypes. **Life Sci.** v. 55, p. 735-749, 1994.
- RIEDEL, W. e NEECK, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. **Z. Reumatol.** v. 60, p. 404 – 415, 2001.
- ROCHA, A.C.C.; FERNANDES, E.S.; QUINTÃO, N.L.M.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.. Relevance of tumour necrosis factor- α for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **Br. J. Pharmacol.** v. 148, n. 5, p. 688-695, 2006.

- ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G.. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by tripsin. **Am. J. Physiol.** v. 156, p. 261-273, 1949.
- RODRIGUES, A.L.; SILVA, G.L.; MATEUSSI, A.S.; FERNANDES, E.S.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S.. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.** v. 70, p. 1347-1358, 2002.
- RODRIGUES-FILHO, R.; SANTOS, A.R.S.; BERTELLI, J.A.; CALIXTO, J.B.. Avulsion injury of the rat brachial plexus triggers hyperalgesia and allodynia in the hindpaws: a new model for the study of neuropathic pain. **Brain Res.** v. 982, n. 2, p. 186-194, 2003.
- ROSENTHAL, A.. Multicomponent receptor for the GDNF/neurturin protein family. **Neural Notes.** v. 3, p. 3-7, 1997.
- RUPNIAK, N.M.J.; BOYCE, S.; WEBB, J.K.; WILLIAMS, A.R.; CARLSON, E.J.; HILL, R.G.; BORKOWSKI, J.A.; HESS, J.F.. Effects of the bradykinin B1 receptor antagonist des-Arg9-[Leu8]-BK and genetic disruption of the B2 receptor on nociception in rats and mice. **Pain.** v. 71, p. 89-97, 1997.
- RUSSO, C.M. e BROSE, W.G. Chronic pain. Ann. **Rev. Med.**, v. 49, p. 123-133, 1998.
- SAARMA, M.. GDNF recruits the signalling crew into lipid rafts. **Trends Neurosci.** v. 24, n. 8, p. 427-429, 2001.
- SABOURIN, T.; BASTIEN, L.; BACHVAROV, D.R.; MARCEAU, F.. Agonist-induced translocation of the kinin B1 receptor to caveolae-related rafts. **Mol. Pharmacol.** v. 61, p. 546-553, 2002.
- SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 101, p. 3680-3685, 2004.
- SAH, D.W.; OSSIPO, M.H.; PORRECA, F.. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 2, n. 6, p. 460-472, 2003.
- SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N.; GALILLY, R.; COHN, Z.A.; KAPLAN, G.. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.** v. 173, p. 699-703, 1991.

- SANG, C.N.. NMDA-receptor antagonists in neuropathic pain: Experimental methods to clinical trials. **J. Pain Symphoms Manag.** v. 19, p. s21-s25, 2000.
- SANTODOMINGO-GARZON, T.; CUNHA, T.M.; VERRI JR, W.A.; VALÉRIO D.A.R.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. **Br. J. Pharmacol.** v. 149, p. 14-22, 2006.
- SCHWARTZMAN, R.J.; GROTHUSEN, J.; KIEFER, T.R.; ROHR, P.. Neuropathic central pain – epidemiology, etiology, and treatment options. **Arch. Neurology.** v. 58, p.1547-1550, 2001.
- SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y.. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain.** v. 43, p. 205-218, 1990.
- SELTZER, Z.. The relevance of animal neuropathy models for chronic pain in humans. **Neurosci.** v. 7, p. 211-219, 1995.
- SCHÄFERS, M.; BRINKHOFF, J.; NEUKIRCHEN, M.M.; SOMMER, C.. Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. **Neurosci. Let.** v. 310, p. 113-116, 2001.
- SCHÄFERS, M.; SORKIN, L.S.; GEIS, C.; SHUBAYEV, V.I.. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. **Neurosci. Let.** v. 347, p. 179-182, 2003.
- SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S.. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. **J. Neurosci.** v. 22, n. 8, p. 3052-3060, 2002.
- SHELTON, D.L.; ZELLER, J.; HO, W-H.; PONS, J.; ROSENTHAL, A.. Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. **Pain.** v. 116, p. 8-16, 2005.
- SHERRINGTON, C.S. **The integrative action of the nervous system.** New York: Scribner, 1906.

- SHUBAYEV, V.I. e MYERS, R.R.. Axonal transport of TNF- α in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors. **J. Neuroimmunol.** v. 114, p. 48-56, 2001.
- SHUBAYEV, V.I. e MYERS, R.R.. Anterograd TNF- α transport from rat dorsal root ganglion to spinal cord and injured sciatic nerve. **Neurosci. Lett.** v. 320, p. 99-101, 2002.
- SIDDALL, P.J. e COUSINS, M.J.. Spinal pain mechanisms. **Spine.** v. 22, p. 98-104, 1997.
- SINDRUP, S.H. e JESSEN, T.S.. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: na update and affect related to mechanism of drug action. **Pain.** v. 83, p. 389-400, 1999.
- SKØTT, O.. Pain: New insights, new treatments? **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 285, n. 1, p. R30-31, 2003.
- SMITH, L.J.; SHIH, A.; MILETIC, G.; MILETIC, V.. Continual systemic infusion of lidocaine provides analgesia in an animal model of neuropathic pain. **Pain.** v. 97, p. 267-273, 2002.
- SNIDER, W.D.. Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. **Cell.** v. 77, p. 627-638, 1994.
- SOMERVILLE, C. The twentieth century trajectory of plant biology. **Cell.** v. 100, p. 13-25, 2000.
- SOMMER, C.. Cytokines and neuropathic pain. In: HANSSON, P.; FIELDS, H.; HILL, R.; MARCHETTINI, P.. (Eds). **Neuropathic pain: pathophysiology and treatment.** Seattle: IASP press 21, p. 37-62, 2001.
- SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A.. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. **Exper. Neurol.** v. 151, p. 138-142, 1998a.
- SOMMER, C.; MARZINIAK, M.; MYERS, R.R.. The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. **Pain.** v. 74, p. 83-91, 1998b.

- SOMMER, C.; PETRAUSCH, S.; LINDENLAUB, T.; TOYKA, K.V.. Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. **Neurosci. Lett.** v. 270, p. 25-28, 1999.
- SOMMER, C.; LINDENLAUB, T.; TEUTEBERG, P.; SCHÄFERS, M.; HARTUNG, T.; TOYKA, K.V.. Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. **Brain Res.** v. 913, p. 86-89, 2001a.
- SOMMER, C.; SCHÄFERS, M.; MARZINIAK, M.; TOYKA, K.V.. Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. **J. Periph. Nerv. Syst.** v. 6, p. 67-72, 2001b.
- STACEY, B.R.. Management of peripheral neuropathic pain. **Am. J. Phys. Méd. Rehabil.** v. 84, n. 3, p. s4-s16, 2005.
- STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H.. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Med.** v. 9, n. 8, p. 1003 – 1008, 2003.
- STOLL, G.; JANDER, S.; MYERS, R.R.. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observation to neuroinflammation. **J. Periph. Nerv. Syst.** v. 7, p. 13-27, 2002.
- STUCKY, C.L.; GOLD, M.S.; ZHANG, X.. Mechanisms of pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 98, n. 21, p. 11845-11846, 2001.
- SUVANTO, P.; HILTUNEN, J.O.; ARUMAE, U.; MOSHNYAKOV, M.; SARIOLA, H.; SAINIO, K.; SAARMA, M.. Localization of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in embryonic rat by in situ hybridization. **Eur. J. Neurosci.** v. 8, p. 816-822, 1996.
- TAL, M. e BENNETT, G.J.. Neuropathic pain sensations are differentially sensitive to dextrophan. **Neuroreport.** v. 5, n. 12, p. 1438-1440, 1994.
- THEODOSIOU, M.; RUSH, R.A.; ZHOU, X.F.; HU, D.; WALKER, J.S.; TRACEY, J.D.. Hyperalgesia due to nerve damage: role of nerve growth factor. **Pain.** v. 81, p. 245-255, 1999.
- THOENEN, H. e SENDTNER, M.. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. **Nat. Neurosci.** v. 5, p. 1046-1050, 2002.

- THOMPSON, S.W.; BENNETT, D.L.; KERR, B.J.; BRADBURY, E.J.; MACMAHON, S.B.. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive response in the spinal cord. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 96, p. 7714-7718, 1999.
- TOBINICK, E.L.. Targeted Etanercept for discogenic neck pain: uncontrolled, open-label results in two adults. **Clin. Therap.** v. 25, p. 1211-1218, 2003.
- TOREBJÖRK, H.E.; LUNDBERG, L.E.; LAMOTTE, R.H.. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. **J. Physiol.** v. 448, p. 765-780, 1992.
- TRACEY, D.J. e WALKER, J.S.. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflamm. Res.** v. 44, p. 407-411, 1995.
- UEDA, H. e INOUE, M.. Animal models and peripheral nociception tests for the study of neuropathic pain. **Folia Pharmacol. Jpn.** v. 188, p. 89-95, 2001.
- URBAN, M.O. e GEBHART, G.F.. Supraspinal contributions to hyperalgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 96, n. 14, p. 7687-7692, 1999.
- VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W.; BEYAERT, R.; FIERIS, W.. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. **Trends Cell Biol.** v. 5, p. 392-399, 1995.
- VAVREK, R. e STEWART, J.M.. Competitive antagonists of bradykinin. **Peptides.** v. 6, p. 161-164, 1985.
- VELLANI, V.; ZACHRISSON, O.; MCNAUGHTON, P.A.. Functional bradykinin B1 receptors are expressed in nociceptive neurons and are upregulated by GDNF. **J. Physiol.** v. 560, n. 2, p. 391-401, 2004.
- VERRI JR, W.A.; SCHIVO, I.R.S.; CUNHA, T.M.; LIEW, F.Y.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.. Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ET_B receptors in a morphine-sensitive manner. **JPET.** v. 310, p. 710-717, 2004.
- WAIKAKUL, S.; WAIKAKUL, W.; PAUSAWASDI, S. Brachial plexus injury and pain: incidence and the effects of surgical reconstruction. **J. Med. Assoc. Thai.** v. 83, p. 708-718, 2000.
- WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A.. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochem. Int.** v. 26, p. 1-16, 1995.

- WALL, P.D.; SCADDING, J.W.; TOMKIEWICZ, M.M.. The production and prevention of experimental anesthesia dolorosa. **Pain**. v. 6, p. 175-182, 1979.
- WANG, L.X. e WANG, Z.J.. Animal and cellular models of chronic pain. **Adv. Drug Delivery Rev.** v. 55, p. 949-965, 2003.
- WATKINS, L.R.; MAIER, S.F.; GOEHLER, L.E.. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain**. v. 63, n. 3, p. 289-302, 1995.
- WATKINS, L.R. e MAIER, S.F.. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol. Rev.** v. 82, n. 4, p. 981-1011, 2002.
- WOOLF, C.J. e CHONG, M.S.. Preemptive analgesia: Treating post-operative pain by preventing the establishment of central sensitization. **Anesth. Analg.** v. 77, p. 362-379, 1993.
- WOOLF, C.J. e MANNION, R.J.. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**. v. 353, p. 1959-1965, 1999.
- WOOLF, C.J. e SALTER, M.W.. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**. v. 288, n. 5472, p. 1765-1769, 2000.
- WOOLF, C.J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor α . **Br. J. Pharmacol.** v. 121, p. 417-424, 1997.
- WOTHERSPOON, G. e WINTER, J.. Bradykinin B1 receptor in constitutively expressed in the rat sensory nervous systems. **Neurosci. Lett.** v. 294, p. 175-178, 2000.
- WYNN PARRY, C.B. Brachial plexus injury. In: VINKEN, P.J.; BRUYN, G.W., ed. **Handbook of Clinical Neurology**. Amsterdam, North-Holland. v.7, p. 143-155, 1970.
- WYNN PARRY, C.B.. Pain in avulsion lesions of the brachial plexus. **Pain**. v. 9, p. 41-53, 1980.
- WYNN PARRY, C.B.. Pain in avulsion of the brachial plexus. **Neurosurgery**. v. 15, p. 960-964, 1984.
- YAMAGUCHI-SASE, S.; HAYASHI, I.; OKAMOTO, H.; NARA, Y.; MATSUZAKI, S.; HOKA, S.; MAJIMA, M.. Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists

or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. **Inflamm. Res.** v. 52, p. 164-169, 2003.

YAMAMOTO, T. e YAKSH, T.T.L.. Effects of colchicine applied to the peripheral nerve on the thermal hyperalgesia evoked with chronic nerve constriction. **Pain.** v. 55, p. 227-233, 1993.

YOSIPOVITCH, G.; MAIBACH, H.I.; ROWBOTHAM, M.C.. Effect of EMLA pre-treatment on capsaicin-induced burning and hyperalgesia. **Acta Derm. Venereol.** v. 79, p. 118-121, 1999.

ZELENKA, M.; SCHÄFERS, M.; SOMMER, C.. Intraneural injection of interleukine-1 β and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain.** v. 116, p. 257-263, 2005.

ZHOU, X.F.; DENG, Y.S.; CHIE, E.; XUE, Q.; ZHONG, J.H.; MCLACHLAN, E.M.; RUSH, R.A.; XIAN, C.J.. Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat. **Eur. J. Neurosci.** v. 11, p. 1711-1722, 1999.

YAMAGUCHI-SASE, S.; HAYASHI, I.; OKAMOTO, H.; NARA, Y.; MATSUZAKI, S.; HOKA, S.; MAJIMA, M.. Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. **Inflamm. Res.** v. 52, p. 164-169, 2003.

ZIMMERMANN, M.. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** v. 16, p. 109-110, 1983.

ZIMMERMANN, M.. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.** v. 429, p. 23-37, 2001.

7. ANEXOS

PUBLICAÇÕES

Parte dos resultados da presente dissertação está submetida à publicação em:

Quintão, N.L.M., Balz, D.; Santos, A.R.S.; Campos, M.M.; Calixto, J.B. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor- α . **Neuropharmacol.** 50(5): 614-620, 2006.

Quintão, N.L.M.; Santos, A.R.S.; Campos, M.M.; Calixto, J.B. The role of neurotrophins in genesis and maintenance of mechanical hypernociception after brachial plexus avulsion in mice. (Manuscrito submetido ao periódico **Pain**).

Quintão, N.L.M.; Passos, G.F.; Balz, D.; Paszcuk, A.F.; Pesquero, J.B.; Campos, M.M.; Calixto, J.B. Neuropathic pain following brachial plexus avulsion in mice: the role of kinin B₁ and B₂ receptors. (Manuscrito em preparação).

Outros trabalhos desenvolvidos durante o doutorado

Rocha, A.C.C.; Fernandes, E.S.; **Quintão, N.L.M.**; Campos, M.M.; Calixto, J.B.. Relevance of tumour necrosis factor- α for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **Br. J. Pharmacol.** v. 148, n. 5, p. 688-695, 2006.

Quintão, N.L.M.; Ferreira, J.; Beirith, A.; Campos, M.M.; Calixto, J.B.. Evaluation of the effects of the herbal product Catuama[®] on inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. (manuscrito aceito para publicação no periódico **Phytomedicine**).

Paszcuk, A.F.; **Quintão, N.L.M.**; Fernandes, E.S.; Campos, M.M.; Juliano, L.; Calixto, J.B.. Mechanisms underlying the nociceptive and inflammatory response induced by trypsin in the mouse paw. (Manuscrito submetido ao periódico **JPET**.)

Quintão, N.L.M.*; Manjavachi, M.N.*; Deschamps, I.K.*; Leal, P.C.*; Campos, M.M.; Calixto, J.B.. Effect of a selective antagonist of CXCR2 receptor, SB225002, on different models of nociception in mice. (Manuscrito em preparação).

Paszcuk, A.F.; Gadotti, V.M.; Tibola, D.; **Quintão, N.L.M.**; Rodrigues, A.L.S.; Calixto, J.B.; Santos, A.R.S.. Antinociceptive activity of agmatine in inflammatory and neuropathic pain models. (Manuscrito em preparação).